

Identifikation von positiven und negativen Funktionen des Transkriptionsfaktors JunB bei der Zellzyklusregulation

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Sven Andrecht
geboren am 17. April 1972, in Neustadt a. Rbge.

2001

Diese Arbeit wurde durchgeführt in der Abteilung Signaltransduktion und Wachstumskontrolle von Herrn Dr. rer. nat. Peter Angel am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Referent: Prof. Dr. Bernhard Lüscher

Korreferent: Prof. Dr. Friedrich Marks

Tag der Promotion: 19. April 2001

*Meiner Mutter Ursula Andrecht und
meinem Vater Heinrich Andrecht gewidmet.*

Concepts without factual content are empty; sense data without concepts are blind... . The understanding cannot see. The senses cannot think. By their union only can knowledge be produced.

Immanuel Kant

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1	3
2.1.1. Die Regulation von AP-1	5
2.1.2. Die Rolle von AP-1 bei der Proliferation	9
2.2. Der Zellzyklus	10
2.2.1. Die aktivierenden Regulatoren des Zellzyklus	11
2.2.2. Die Inhibitoren des Zellzyklus	13
2.3. Fragestellung	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Material	16
3.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen	16
3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial	18
3.1.3. Enzyme	19
3.1.4. Radiochemikalien	19
3.1.5. Antikörper	19
3.1.6. Proben für Northern-Blot Analysen	20
3.1.7. Oligonukleotide für Protein/DNA-Bindungsstudien	20
3.1.8. Oligonukleotide für die PCR	20
3.1.9. Nährmedien für die Bakterienkultur	21
3.1.10. Lösungen und Puffer	21
3.1.11. Bakterienstämme	21
3.1.12. Zellen	22
3.2. DNA-Methoden	23
3.2.1. Allgemeine DNA-Techniken	23
3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR)	28
3.2.3. Sequenzierung von DNA	28
3.2.4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	29
3.2.5. Transformation von DNA in <i>E.coli</i> Bakterien	30

3.3. RNA-Methoden	31
3.3.1. Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski u. Sacchi, 1987)	31
3.3.2. RT-PCR	31
3.3.3. Gelelektrophorese von RNA	32
3.3.4. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)	32
3.3.5. Hybridisierung der RNA	32
3.4. Protein-Methoden	33
3.4.1. Herstellung von Proteinextrakten	33
3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry et al., 1951)	33
3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.4.4. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen	35
3.4.5. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	35
3.4.6. Immunpräzipitation von Proteinen	36
3.4.7. <i>in vitro</i> Kinase-Aktivitätsbestimmung	36
3.4.8. Bestimmung der Chloramphenicol-Azetyltransferase-Aktivität („CAT-Assay“)	37
3.4.9. Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen	38
3.4.10. DNA/Protein-Bindungsstudien (EMSA)	39
3.4.11. Luziferase- und LacZ-Bestimmung	40
3.5. Zellkultur	41
3.5.1. Trypsinieren von Zellen	41
3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
3.5.3. Synchronisation der Zellen in der G ₀ /G ₁ -Phase	42
3.5.4. Synchronisation der Zellen in der S-Phase	42
3.5.5. Behandlung der Zellen mit TPA	42
3.5.6. Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen	42
3.6. FACS-Analyse	43
3.6.1. Detektion von DNA mittels FACS	43
3.6.2. Detektion von BrdU mittels FACS	43
3.7. Immunhistologische Bestimmung der S-Phase-Zellen	44

4. Ergebnisse	45
4.1. <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten zeigen eine normale Proliferation	45
4.2. Verändertes Zellzyklusprofil in den JunB-defizienten Fibroblasten	47
4.3. Verstärkte Aktivität von Zyklin D-abhängigen Kinase-Komplexen in der G ₁ -Phase	50
4.4. Die Transkript- und Proteinmenge des Zellzyklus-Inhibitors p16 ^{Ink4a} ist in Abwesenheit von JunB reduziert	52
4.5. Reduzierte Expression von p53 und veränderte Aktivierungskinetik von c-Jun in den JunB-defizienten Fibroblasten	54
4.6. Verlangsamtes Durchlaufen der S/G ₂ /M-Phasen in den <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten	55
4.7. Reduzierte Aktivität von Zyklin A- und Zyklin B-abhängigen Kinase-Komplexen in den S/G ₂ /M-Phasen	57
4.8. JunB verstärkt die Transkription am <i>Zyklin A</i> -Promotor	59
4.9. Die Überexpression von JunB führt zu einer verlangsamten Proliferation und einem Anstieg der p16 ^{Ink4a} -Expression	63
4.10. Ein posttranslationell-aktivierbares JunB-ER-Protein revertiert die Zellzyklus-Defekte in den JunB-defizienten Fibroblasten	64
5. Diskussion	70
5.1. Die Rolle von JunB im G ₁ /S-Übergang	70
5.2. Die Rolle von JunB im S/G ₂ /M-Übergang	74
5.3. Der Verlust von JunB verursacht die Zellzyklusdefekte	77
5.4. Duale Rolle von JunB in der Zellzyklusregulation	78
6. Ausblick	80
7. Literaturverzeichnis	82
8. Anhang	96

Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Standard (SI-Einheiten)

Abb.	Abbildung	FCS	fötales Kälberserum
AP-1	Aktivator Protein 1	FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FITC	Fluoresceinisothiocyanat (grün fluoreszierender Farbstoff)
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor	g	Gramm
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	G-Phase	„gap“, Zellzyklusphase
bp	Basenpaar	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
BrdU	Bromodesoxyuridin	GR	Glukokortikoidrezeptor
BSA	Rinderserumalbumin	GST	Glutathion-S-Transferase
bZip	basische Region und „Leucine-Zipper“	h	„hour“, Stunde
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-3'-Monophosphat	H ₂ O	deionisiertes Wasser
CAT	Chloramphenicoltransferase	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
CDK	Zyclin- abhängige Proteinkinase	IL-1	Interleukin 1
cDNA	Komplementäre DNA	JNK	Jun-aminoterminal-Kinase
CKI	CDK Inhibitor	kb	Kilobasen
cpm	„counts per minute“, Signale pro Minute	kDa	Kilodalton
d	„day“, Tag	M	molar (Mol/Liter)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	M-Phase	Mitose
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
DMEM	„Dulbecco's minimal essential medium“, Nährmedium	MBq	Megabequerel
DMSO	Dimethylsulfoxid	MEF	embryonale Mausfibroblasten
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MEK	MAPK/ERK-Kinase
DNase	Desoxyribonuklease	min	Minute
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	mM	Millimolar
DTT	Dithiothreitol	MMP	Matrixmetalloproteinasen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MOPS	3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure
ECL	„enhanced chemoluminescence“, verstärkte Chemolumineszenz	mRNA	„Messenger ribonucleic acid“, Boten RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MV	Maloney Virus
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	NE	„Nuclear extracts“, Kern-extrakte
EMSA	Elektromobilitäts Analyse	OD	Optische Dichte
ER	Östrogenrezeptor	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ERK	„Extracellular signal regulated Kinase“, MAP-Kinase	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
F-9	Maus Teratokarzinomzellen	p.c.	„post coitum“, nach der Befruchtung
FACS	„Fluorescence activated cell sorter“, Durchflußzytometer	PCR	Polymerasekettenreaktion
f.c.	Endkonzentration	PKA	Proteinkinase A
		PKC	Proteinkinase C

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
S-Phase	DNA-Synthesephase
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat/EDTA
TCF	„Ternary complex factor“, Transkriptionsfaktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TM	4-Hydroxy-Tamoxifen
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TRE	„TPA- responsive element“, AP-1-Bindungssequenz
Tris	tris-Hydroxymethylaminomethan
U	„unit“, Enzymeinheit
Ubi	Ubiquitin C
UV	ultraviolette Strahlung
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor AP-1, ein Sammelbegriff für gleichzeitig in der Zelle vorkommende Proteindimere aus den strukturell nahe verwandten Produkten der *Jun*-, *Fos*- und *ATF*-Genfamilien, stellt einen wichtigen Endpunkt mitogen- und stress-aktivierter Signaltransduktionskaskaden dar. Somit greift AP-1 entscheidend in die Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Transformation und programmiertem Zelltod (Apoptose) ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die bis dahin unbekannten Aufgaben der AP-1-Untereinheit JunB bei der Zellproliferation zu definieren. Dazu wurden Fibroblasten aus E9.5 p.c. Mausembryonen isoliert, in denen das *junB*-Gen gezielt inaktiviert worden ist. Diese primären als auch davon abgeleitete immortalisierte Fibroblasten sind in ihrer Proliferation insgesamt nicht verändert. Allerdings kommt es durch den Verlust repressorischer JunB-Funktionen zu einer verlängerten c-Jun-Aktivierung, zur De-Repression von Zyklin D1 und somit insgesamt zur früheren Induktion des Zyklin D1-Promotors. Das Fehlen von aktivierenden Funktionen hat zudem eine stark verminderte Expression des zyklinabhängigen Kinase-Inhibitors p16^{INK4a} zur Folge. Obwohl all diese Veränderungen letztlich dazu beitragen, daß *junB*^{-/-}-Fibroblasten deutlich schneller von der G₁- in die S-Phase übergehen, sorgt eine Verlangsamung am S/G₂/M-Übergang aufgrund verminderter zeitlich verzögert auftretender Aktivitäten von Zyklin A-CDK2 und Zyklin B-CDC2 dafür, daß die Proliferationsrate in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten nicht verändert ist. Promotorstudien und Koexpressionsexperimente führten zur Identifizierung von Zyklin A als zweitem Zellzyklusregulator neben p16^{INK4a}, dessen transkriptionelle Aktivierung JunB-abhängig ist.

Die beobachteten molekularen Veränderungen in *junB*^{-/-}-Fibroblasten während des Zellzyklusdurchlaufs werden ausschließlich durch den Verlust von JunB hervorgerufen, denn sie können durch das Wiedereinbringen eines aktivierbaren JunB-ERTM-Proteins revertiert werden. Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz mit genetisch veränderten *junB*^{-/-}-Zellen liefert die wertvolle Erkenntnis, daß einzigartige positive und auch negative Funktionen von JunB für eine geordnete Zellzyklus-Progression notwendig sind und stellt eine entscheidende Verbindung zwischen JunB-Funktion und Zellzyklusregulation her.

Schlagwörter: JunB / Zellzyklus / Zyklin A

1. Summary

The transcription factor AP-1, composed of dimeric protein complexes, which consist of structurally related members of the *jun*, *fos* and *ATF* gene families, is at the receiving end of mitogen- and stress-activated signal transduction cascades. Thus, AP-1 is implicated in the regulation of important cellular processes such as proliferation, differentiation, transformation and programmed cell death (apoptosis).

Aim of the presented work was to define the yet unknown role of the AP-1 subunit JunB in cell proliferation using *junB*^{-/-} fibroblasts derived from E9.5 p.c. mouse embryos with a targeted mutation in the *junB* gene. For the time being, primary as well as subsequently derived immortal fibroblasts were not altered in proliferation. However, loss of JunB repressor functions leads to prolonged c-Jun activation and concomitantly, to a de-repression and a premature induction of the cyclin D1 promoter. The lack of JunB-dependent activating functions results in a strongly decreased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a}. Despite the accelerated G₁- to S-phase transition, *junB*^{-/-} cells do not exhibit an enhanced proliferation rate, because it is compensated by a deceleration at the S to G₂/M transition. This phenotype is caused by delayed and diminished activities of cyclin A-CDK2 and cyclinB-CDC2. Promoter as well as co-expression studies led to the identification of Cyclin A as second cell cycle regulator in addition to p16^{INK4a} whose expression is regulated in a JunB-dependent manner.

The observed molecular alterations in cell cycle progression of *junB*^{-/-} fibroblasts are solely caused by the lack of JunB since they can be reverted upon reintroduction of an inducible JunB-ERTM protein. The approach applied in this work yielded valuable insights eliciting unique positive as well as negative regulatory functions of JunB for proper cell cycle progression and provides evidence for a direct link between JunB function and cell cycle regulation.

key words: JunB / cell cycle / cyclin A

2. Einleitung

Biologische Prozesse wie Proliferation und Differenzierung werden in einem vielzelligen eukaryontischen Organismus durch die differentielle Expression spezifischer Gene als Antwort auf extrazelluläre Stimuli reguliert. Zu diesen Stimuli gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Tumor-Promotoren und DNA-schädigende Agenzien. Sie interagieren direkt mit der DNA bzw. binden an membranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren und lösen Signaltransduktionskaskaden bis in den Zellkern aus. Bestandteile dieser Signalketten sind Enzyme wie Kinasen und Phosphatasen, die im Zellkern zur Aktivierung bzw. Reprimierung von spezifisch DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren führen.

2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Genen spielt der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein-1), da er die oben angeführten extrazellulären Stimuli in eine veränderte Genexpression umsetzt (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987a,b; Angel und Karin, 1991; Angel und Herrlich, 1994; Karin et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor AP-1 besteht aus Proteindimeren, die sich bei Säugetieren aus einer Kombination der verschiedenen Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF-Proteinfamilien zusammensetzen. Die Familie der Jun-Proteine besteht aus c-Jun, JunB und JunD; die der Fos-Familie aus c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2, und die der ATF-Familie aus ATF2, ATF3/LRF1, ATFa und B-ATF (als Übersicht Vogt und Bos, 1990; Angel und Karin, 1991; Goetz et al., 1996; Karin et al., 1997). Durch Mutationsanalysen wurden konservierte charakteristische Eigenschaften zwischen diesen Proteinen entdeckt, die zur Einordnung in die bZip-Proteinfamilie geführt hat (Landschulz et al., 1988). Die bZip-Region besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten, der basischen Region und dem sogenannten „Leucine-Zipper“. Die aus 12 bis 14 basischen Aminosäuren zusammengesetzte basische Region ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich (Vogt und Bos, 1990), während die „Leucine-Zipper“ Region für die Dimerisierung der AP-1-Untereinheiten benötigt wird.

Die Proteine der Jun-Familie können sowohl Heterodimere mit Mitgliedern der Fos- und ATF-Familie als auch Homodimere bilden (Kouzarides und Ziff, 1988; Nishizawa et al., 1989; Smeal et al., 1989; Zerial et al., 1989; Matsui et al., 1990;

Ziff, 1990; Hai und Curran, 1991; Hsu et al., 1991; Dorsey et al., 1995). Ähnliches gilt für die Mitglieder der ATF-Familie, die ebenfalls Hetero- und Homodimere bilden können (Ziff, 1990; Hai und Curran, 1991). Aufgrund der elektrostatischen Eigenschaften ihres „Leucine-Zippers“ können die Mitglieder der Fos-Familie keine Homodimere bilden. Da die Proteindimerisierung aber Voraussetzung für die DNA-Bindung ist, können sie nicht alleine an die DNA binden. Durch die vielfältigen Möglichkeiten einer Dimerisierung der Mitglieder der AP-1-Familie ergeben sich eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten. Die Spezifität, mit der die Dimere an die DNA binden, und auch ihre Funktion ist dabei abhängig von der Dimer-Zusammensetzung (Hai und Curran, 1991).

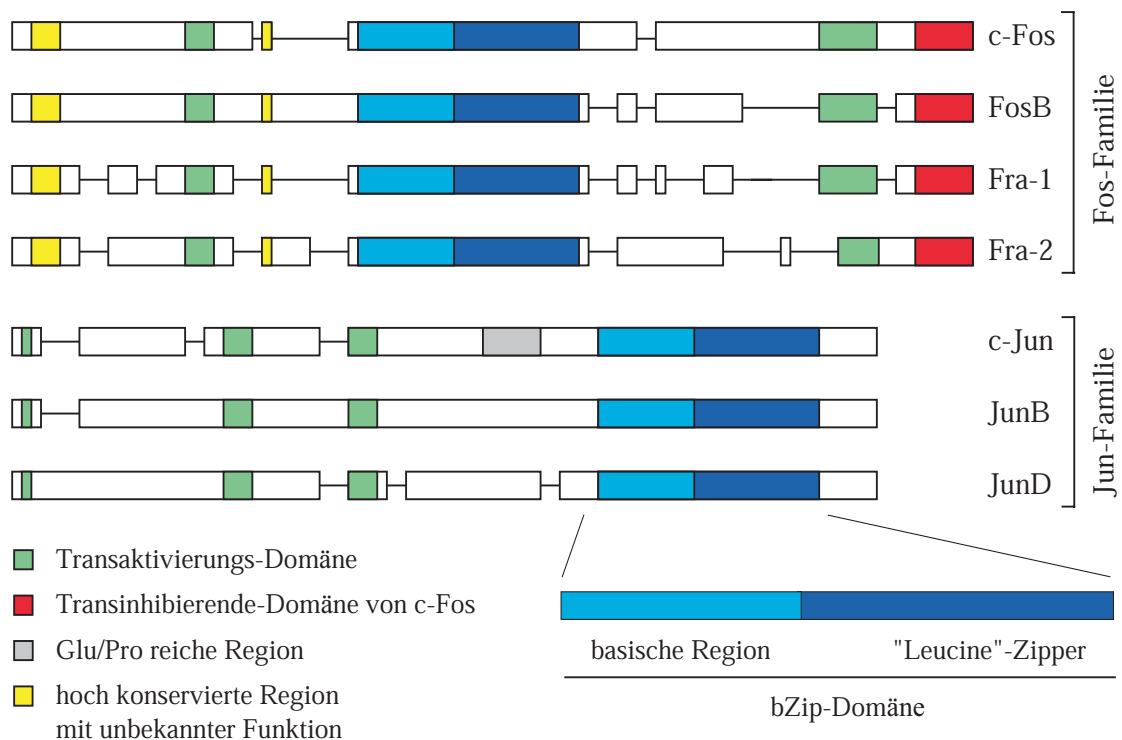


Abb. 1: Schematische Darstellung der Jun- und Fos-Proteine

Die DNA-Konsensussequenz, an die die verschiedenen AP-1-Komplexe binden, ist das sogenannte TRE („TPA responsive element“, $TGA_C/GTCA$), welches ursprünglich in der Promotor-Region des menschlichen Kollagenase-Gens definiert wurde (Angel et al., 1987a,b). Mittlerweile ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die funktionelle TREs in ihren Promotorsequenzen aufweisen. Sie kodieren unter anderem für Wachstumsfaktoren (z.B. *NGF*, Hengerer et al., 1990), Metalloproteinasen (z.B. *Kollagenase*, Angel et al., 1987a; *Stromelysin*, Kerr et al., 1988; *Urokinase*,

Nerlov et al., 1991; *MMP-9*, Gum et al., 1996; Crowe und Brown, 1999), Transkriptionsfaktoren (z.B. *Fra-1*, Bergers et al., 1995), Zellzyklusregulatoren (z.B. *Zyklin D1*, Albanese et al., 1999; Sabbah et al., 1999; Bakiri et al., 2000; *p53*, Schreiber et al., 1999; *p16^{INK4a}*, Passegue und Wagner, 2000) und zelltypspezifische Genprodukte (z.B. *Keratin 18*, Oshima et al., 1990; Pankov et al., 1994; Rhodes und Oshima, 1998; *Involucrin*, Ng et al., 2000; Phillips et al., 2000). Der *c-jun*-Promotor enthält ebenfalls TRE-ähnliche DNA-Sequenzen, an die bevorzugt c-Jun/ATF-Heterodimere oder ATF-Homodimere binden (Benbrook und Jones, 1990; van Dam et al., 1993; Herr et al., 1994; Angel et al., 1988b). Diese c-Jun/AP-1 DNA-Sequenzen besitzen im Zentrum ein zusätzliches Basenpaar (Jun1: TGACATCA; Jun2: TTACCTCA).

Aufgrund der DNA-Bindesepezifität und der Fähigkeit zur Dimerisierung mit Jun oder Fos wurden weitere bZIP-Proteine identifiziert (als Übersicht Karin, et al., 1997): die Maf-Proteine (v-Maf, c-Maf), das Genprodukt des neuronalen retina-spezifischen Gens (Nishizawa, et al., 1989; Swaroop et al., 1992), sowie die beiden Jun-Dimerisierungspartner JDP1 und JDP2 (Aronheim et al., 1997).

Für den direkten oder indirekten Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie weisen die AP-1-Proteine eine dritte funktionelle Domäne auf, die Transaktivierungsdomäne, die maßgeblich die Transkriptionsrate des Zielgens beeinflusst (Angel und Karin, 1991).

2.1.1. Die Regulation von AP-1

Die Regulation von AP-1 geschieht auf verschiedenen Ebenen. Bei der transkriptionellen Aktivierung und der posttranslationellen Modifikation sind extrazelluläre Signale, die innerhalb der Zelle Signaltransduktionskaskaden aktivieren, von entscheidender Bedeutung. Wichtiger Bestandteil dieser Signalketten sind Kinasen und Phosphatasen, die im Zellkern zu einer Aktivierung bzw. Reprimierung des Transkriptionsfaktors führen (Karin und Smeal, 1992; Karin, 1994).

Die Signaltransduktionswege können durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, wie dem EGF- und bFGF-Rezeptor (Aho et al., 1997; Sachsenmaier et al., 1994) oder von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie der Parathormon/Parathormon-verwandtes-Peptid-Rezeptor (PTH/PTHrP-Rezeptor; Clohisy et al., 1992) ausgelöst werden. Die Rezeptoraktivierung führt unter anderem zur Freisetzung des

Botenstoffes Diacylglycerol (DAG), der seinerseits die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Außer DAG sind Phorbolester, die stark tumorpromovierende Agenzien darstellen, wie das 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) effiziente Aktivatoren der PKC, weswegen die Behandlung von Zellen mit TPA zumindest teilweise die Wirkung von Serum- und Wachstumsfaktoren imitiert.

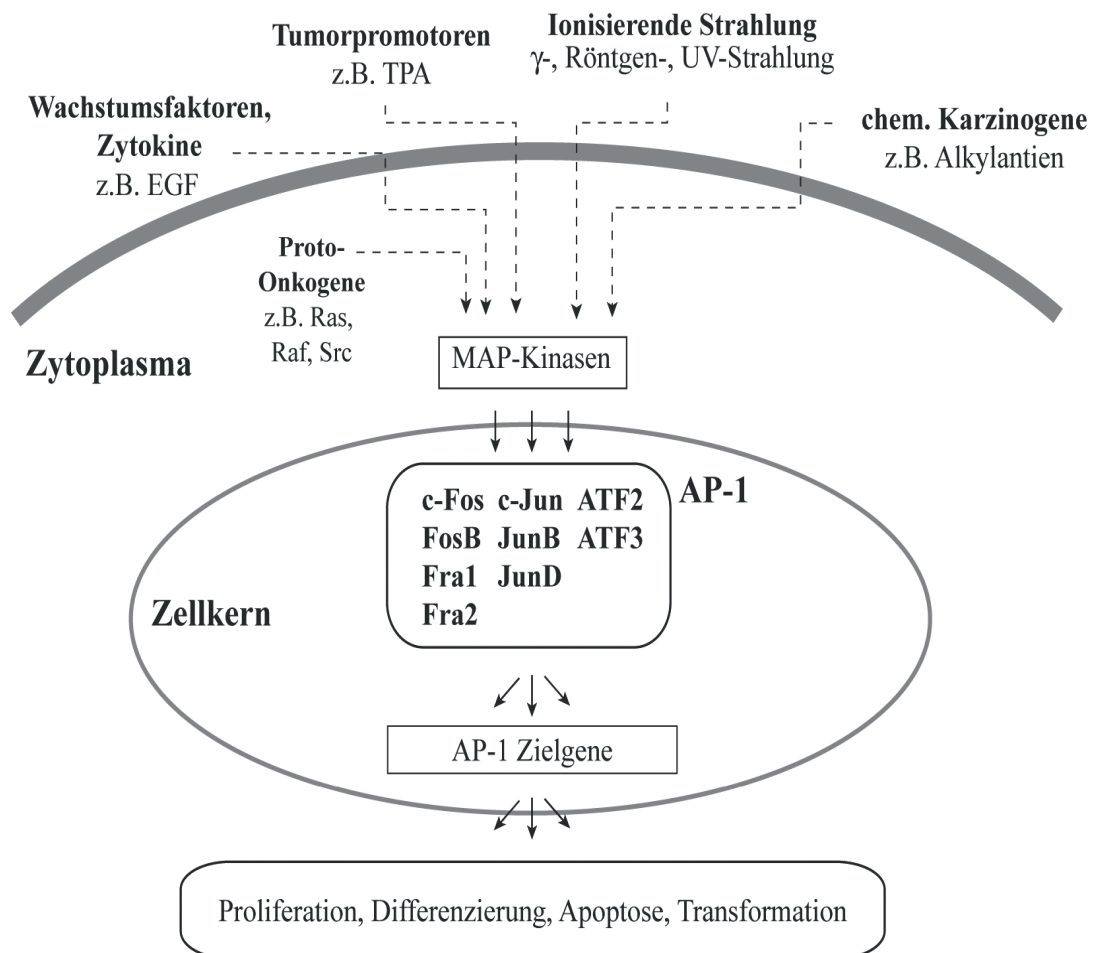


Abb. 2: Darstellung der Signaltransduktionskaskade, die zur transkriptionellen Aktivierung von AP-1-abhängigen Zielgenen führt.

Die PKC wirkt als Serin/Threonin-Kinase und aktiviert eine Vielzahl von Substraten. Die Phosphorylierung der Proteinkinase Raf-1 (Marais et al., 1998), die durch das GTP-bindende-Protein Ras an die Zellmembran rekrutiert wird (Leevers et al., 1994), steht am Anfang einer Proteinphosphorylierungskaskade, in deren Verlauf die MAP-Kinasen („mitogen activated protein kinases“) induziert werden (Marshall, 1995; Cano und Mahadevan, 1995). Zu der Familie der MAP-Kinasen gehören ERK1 und ERK2, Jun N-terminale Kinasen (JNK, auch als SAPK bezeichnet, mit minde-

stens zehn verschiedenen Isoformen) und p38 (Minden und Karin, 1997). ERK1 und ERK2 („extracellular signal-regulated protein kinase“) modifizieren hauptsächlich die Transkriptionsfaktoren TCF („ternary complex factor“) und Elk-1, die JNKs phosphorylieren die Transaktivierungsdomänen von c-Jun und ATF-2 (Karin, 1995; Karin und Hunter, 1995), während p38 ATF-2 und den Transkriptionsfaktor Max (Kyriakis und Avruch, 1996) aktiviert. Die Phosphorylierung von c-Jun, ATF-2 und TCF führt zur raschen Expression des *c-jun*-, *junB*- bzw. *c-fos*-Gens („immediate early genes“) und zur anschließenden Modulierung von AP-1-Zielgenen (Karin et al., 1997).

Neben der PKC-Signaltransduktionskaskade gibt es die der Proteinkinase A (PKA) als weiteren wichtigen Signalweg in der Zelle. Die Induktion der PKA-Kaskade durch den sekundären Botenstoff cAMP führt im Zellkern zur Regulation von Genen, die ein sogenanntes „cAMP responsive element“ (CRE; TGACGTCA) in ihrem Promotor aufweisen. An diese CRE-Erkennungssequenz binden hauptsächlich Proteine der CREB-Proteinfamilie. Die PKA- und die PKC-Signaltransduktionskaskade üben zumeist antagonistische Funktionen aus wie bei dem *c-jun*-Promotor, sie können aber auch synergistisch interagieren wie zum Beispiel am *junB*-Promotor (Karin und Smeal, 1992).

Neben der Regulation des Transaktivierungspotentials beeinflusst die posttranslationelle Modifikation der AP-1-Untereinheiten auch die Halbwertszeit der Proteine. Die Phosphorylierungen der Serine 63 und 73 in c-Jun durch JNKs sind wichtig für eine verstärkte Transaktivierung (Smeal et al., 1991; Smeal et al., 1992), aber ebenso für eine Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins (Treier et al., 1994). Für JunB wird angenommen, daß eine Phosphorylierung der Serine 23 und 186 und des Threonins 150 durch p34^{cdc2} während der Mitose zu einer Degradierung des Proteins führt (Bakiri et al., 2000). Durch die posttranslationelle Modifikationen kann desweiteren auch die Affinität der Proteine zur DNA reguliert werden. So führt die Dephosphorylierung von Serinen und Threoninen (Serin 243 und 249, sowie Threonin 231 und 239) in der DNA-Bindedomäne von c-Jun zu einer erhöhten DNA-Bindungsaffinität (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992).

Weitere Möglichkeiten der Regulation von AP-1 sind Protein-Protein-Wechselwirkungen (Karin, et al., 1997). So hemmen sich MyoD und c-Jun gegenseitig durch direkte Interaktion (Su et al., 1991; Li et al., 1992; Bengal et al., 1992), während

NF- κ B und AP-1 synergistisch wirken können (Stein et al., 1993). Ein weiteres mit AP-1 interagierendes Protein ist der Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Dieser ist nach der Aktivierung in der Lage, die c-Jun/c-Fos-vermittelte TPA-induzierte Transaktivierung der Kollagenase zu hemmen (Jonat et al., 1990; Yang Yen et al., 1990; Schüle et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995). Dabei ist der Mechanismus der Hemmung unabhängig von der Bindung des GR an die DNA (Reichardt et al., 1998; Tuckermann et al., 1999).

Die Regulation der individuellen Familienmitglieder, die sich nicht nur in ihrer Transaktivierungsspezifität und Bindungsaffinität unterscheiden, sowie ihre Funktionen können durch unterschiedliche experimentelle Ansätze, wie Überexpression der einzelnen Proteine oder das Einsetzen von dominant-negativ-wirkenden Mutanten, untersucht werden. Zur Bestimmung der individuellen Aufgaben der einzelnen AP-1-Mitglieder wurden jedoch die jeweiligen Gene spezifisch mit Hilfe der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ausgeschaltet („knock out“). Dieser Ansatz hat gezeigt, daß die einzelnen Mitglieder der AP-1-Familie sehr spezifische Funktionen ausüben. Die Expression von c-Jun, JunB und Fra1 sind lebensnotwendig, da Embryonen, die die jeweiligen Proteine nicht exprimieren, während ihrer pränatalen Entwicklung aufgrund unterschiedlicher Defekte sterben (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993; Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind c-Fos-, ATF2-, FosB- oder JunD-defiziente Mäuse lebensfähig, zeigen aber auch individuelle phänotypische Veränderungen (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992; Reimold et al., 1996; Gruda et al., 1996; Thepot et al., 2000). FosB-defiziente Mäuse weisen ein verändertes Verhalten bei der Aufzucht und Pflege ihrer Nachkommen auf (Brown et al., 1996). Männliche *JunD*^{-/-}-Mäuse haben altersabhängige Defekte in den Reproduktionsorganen (Thepot et al., 2000). *ATF2*^{-/-}-Mäuse zeigen Defekte im Zentralnervensystem und der endochondrialen Ossifikation, während *c-fos*^{-/-}-Mäuse Osteopetrose entwickeln, da es zu keiner terminalen Differenzierung von Osteoklasten kommt (Johnson, et al., 1992; Wang, et al., 1992; Reimold, et al., 1996; Grigoriadis et al., 1994). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die einzelnen Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF-Familie essentiell für spezifische biologische Prozesse sind und nicht redundante Funktionen haben.

2.1.2. Die Rolle von AP-1 bei der Proliferation

Durch mehrere unabhängige experimentelle Ansätze wurde herausgefunden, daß AP-1 entscheidend an der Regulation der Proliferation beteiligt ist. So führt eine Stimulation von Zellen, die durch Entzug von Wachstumsfaktoren in der G_0 -Phase des Zellzyklus arretiert worden sind, zu einer schnellen Induktion der frühen, sogenannten „immediate early“ Gene (Angel und Karin, 1991). Die Expression der *c-jun*-RNA in logarithmisch wachsenden Zellen ist im Vergleich zu G_0 -arretierten Zellen verstärkt (Angel et al., 1988b; Ryseck et al., 1988) und die Mikroinjektionen von Antikörpern gegen AP-1-Mitglieder oder der Einsatz von „antisense“-RNA führen zu einer verminderten DNA-Synthese und arretieren die Zellen in der G_0/G_1 -Phase (Kovary und Bravo, 1991; Riabowol et al., 1992; Smith und Prochownik, 1992). Desweiteren zeigen *c-Jun*-überexprimierende Zellen einen schnelleren Übergang von der G_1 - in die S-Phase, was zu einer vergrößerten S/ G_2 -Phase-Population führt. Im Gegensatz dazu verlangsamt die Überexpression von JunD die Proliferation und vergrößert die G_0/G_1 -Phase-Population (Pfarr et al., 1994).

Ein weiterer Hinweis, daß AP-1 in der Proliferation eine wichtige Rolle spielt, hat sich bei der Analyse von *c-Jun*-defizienten Fibroblasten ergeben. Diese Fibroblasten proliferieren langsamer aufgrund einer veränderten Transkription der *c-Jun*-abhängigen Zellzyklus-Regulatoren p53 und Zyklin D1 (Schreiber et al., 1999; Wisdom et al., 1999).

Über die Rolle von JunB im Prozeß der Proliferation ist dagegen noch sehr wenig bekannt. *In vitro* Transfektions- und Transformationsstudien haben bisher nur gezeigt, daß JunB sowohl die *c-Jun*-vermittelte Transformation als auch die *c-Jun*-abhängige Transaktivierung von Promotoren mit einer AP-1-Bindungsstelle hemmt und damit die *c-Jun*-abhängige AP-1-Aktivität negativ reguliert (Chiu et al., 1989; Schütte et al., 1989; Deng und Karin, 1993). Im Gegensatz dazu kann JunB aber artifizielle und natürliche Promotoren mit multiplen AP-1-Bindungsstellen transaktivieren wie zum Beispiel bei dem Wachstumshormon-verwandten, angiogenetisch wirkenden Peptid Proliferin (Chiu et al., 1989; Groskopf und Linzer, 1994; Schorpp-Kistner et al., 1999).

In der Primärstruktur unterscheidet sich JunB von *c-Jun* durch eine kleine Anzahl von Aminosäureaustauschen in der DNA-Bindungs- und der Dimerisierungs-Domäne. Diese Veränderungen haben zur Folge, daß JunB nur mit niedriger Effizienz

Homodimere, sondern vielmehr Heterodimere mit c-Jun bildet, die nicht so effizient an die DNA binden wie c-Jun-Homodimere (Deng und Karin, 1993). Da die Heterodimere gegenüber den c-Jun-Homodimeren bevorzugt gebildet werden, kann die c-Jun-Transaktivierung durch vorhandenes JunB gehemmt werden. Zusammen mit Expressionsstudien während der Organentwicklung im Mausembryo, die eine unterschiedliche gewebsspezifische Expression für JunB und c-Jun festgestellt haben (Wilkinson et al., 1989), deuten diese Daten darauf hin daß die beiden Proteine trotz ihres hohen Verwandtschaftsgrads unterschiedliche Funktionen besitzen. Besonders deutlich werden diese unterschiedlichen Funktionen bei der Analyse der c-Jun- bzw. JunB-defizienten Mausembryonen. Die c-Jun-defizienten Embryonen sterben an Tag 13.5 p.c. ihrer Embryonalentwicklung durch Defekte in der Leber- und Herzentwicklung (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993). Im Gegensatz dazu sind die JunB-defizienten Embryonen stark wachstumsretardiert und sterben aufgrund von vaskulo- und angiogenetischen Defekten bei der Plazentaentwicklung zwischen Tag 8.5 und Tag 10 p.c. der Embryonalentwicklung (Schorpp-Kistner et al., 1999). Dieses Ergebnis macht deutlich, daß eine Komplementation von JunB durch c-Jun zumindest bei diesen Prozessen nicht möglich ist.

Die postulierten, nicht redundanten Funktionen von JunB in biologischen Prozessen und die Tatsache, daß JunB hemmend auf das in den Zellzyklus eingreifende Protein c-Jun wirkt, deuten darauf hin, daß JunB einen Einfluß auf die Regulation der Proliferation und des Zellzyklus besitzt.

2.2. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen läßt sich vereinfacht in vier Abschnitte einteilen: G_1 - („Gap“=Lücke), S- (Synthese der DNA), G_2 - und M- (Mitose) Phase. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt, die während der M-Phase zu gleichen Teilen in die beiden Tochterzellen weitergegeben wird. Die Übergänge zwischen den jeweiligen Zellzyklusphasen sind streng kontrolliert. Besonders wichtige Kontrollpunkte befinden sich am Ende der G_1 -Phase vor der Verdopplung der DNA (Restriktionspunkt) und am Übergang von der G_2 - in die M-Phase bevor das Erbgut aufgeteilt wird. Diese Kontrollpunkte sollen vor allem sicherstellen, daß die DNA vor der Zellteilung intakt ist. Die basalen molekularen Mechanismen sind allerdings nur teilweise bekannt.

Zu Beginn des Zellzyklus (G_1 -Phase) reagieren die Zellen auf eine Vielzahl von Stimuli, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Erst beim Erreichen des Restriktionspunktes am Ende der G_1 -Phase nimmt dieser Einfluß ab und es wird überprüft, ob die Zelle bereit ist, in die nächste Phase einzutreten. Ein Übergang in die S-Phase ist erst möglich, wenn die Zelle ausreichend für die DNA-Synthese vorbereitet ist (Zellgröße, Proteinstatus, intakte DNA, essentielle Aminosäuren und Nukleotide; Pardee, 1989). Ungünstige Wachstumsbedingungen wie Nährstoffmangel oder DNA-Schäden können dafür sorgen, daß die Zellen reversibel am Restriktionspunkt in der G_1 -Phase (oft auch als G_0 -Phase bezeichnet) angehalten werden oder bei zu großen Schäden in den programmierten Zelltod (Apoptose) gehen (als Übersicht Sherr, 1994; Sherr, 1995).

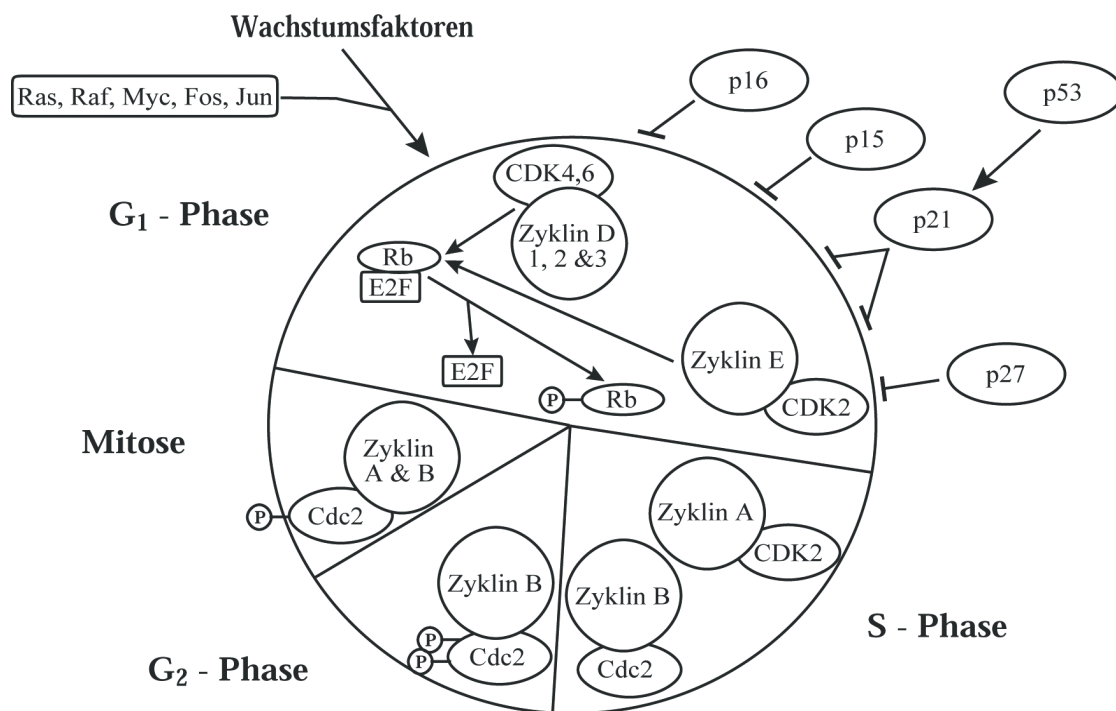


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Zellzyklusregulation (verändert nach Hunter, T. und Pines, J., 1994)

2.2.1. Die aktivierenden Regulatoren des Zellzyklus

Schlüsselregulatoren der G_1 -Phase, der längsten Phase des Zellzyklus, sind die D-Zykline (Zyklus D1, -D2, -D3), die mit den Zyklus-abhängigen Kinasen CDK4 oder CDK6 einen aktiven Komplex bilden, und das mit CDK2 interagierende Zyklus E (Übersicht in Sherr, 1994; Sherr, 1995).

Die D-Zykline werden nach Mitogenstimulation transkriptionell induziert und haben ihre stärkste Expression vor dem Übergang von der G₁- in die S-Phase. Werden den Zellen allerdings Wachstumsfaktoren entzogen, so findet eine Arretierung der Zellen in der G₁-Phase und ihr Abbau statt. Die Zyklin-abhängigen Kinasen werden konstant während des Zellzyklus exprimiert, jedoch ist für ihre Funktion eine Bindung an die jeweiligen Zykline notwendig. Die Aktivität der Zyklin D-abhängigen Kinase-Komplexe tritt in der Mitte der G₁-Phase auf und ist bis zum Übergang in die S-Phase nachzuweisen (Matsushime et al., 1994; Meyerson und Harlow, 1994). Mikroinjektionsstudien mit Antikörpern gegen Zyklin D1 in Fibroblasten belegen die Bedeutung von Zyklin D-abhängigen Kinase-Komplexen in diesem Zellzyklus-Abschnitt (Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993).

Im Gegensatz zu den D-Zyklinen wird Zyklin E periodisch im Zellzyklus exprimiert (mit einem Maximum gegen Ende der G₁-Phase). Es bildet zusammen mit CDK2 einen Komplex, der beim Übergang von der G₁- in die S-Phase aktiv ist (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992; Ohtsubo et al., 1995). Sobald sich die Zellen in der S-Phase befinden, wird Zyklin E durch Ubiquitinierung abgebaut und CDK2 freigesetzt. Eine Hemmung von CDK2 führt zu einer Blockierung der Zellen in G₁ (Pagano et al., 1993; Tsai et al., 1993; van den Heuvel und Harlow, 1993), während eine Überexpression von Zyklin E und/oder Zyklin D zu einer Verkürzung der G₁-Phase sowie zu einer reduzierten Zellgröße und einer verringerten Abhängigkeit der Zellen gegenüber Mitogenen führt (Ohtsubo und Roberts, 1993; Quelle, et al., 1993).

Eine wesentliche Aufgabe der G₁-Phase-Zykline ist die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) und pRb-verwandter Proteine, wie p107 oder p130 (Weinberg, 1995; Johnson et al., 1998). Hypophosphoryliertes pRb bildet zusammen mit den Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und den Dimerisierungs-Proteinen (DP) einen Komplex. Durch diese Komplexbildung wird die Transaktivierungsfunktion von E2F reprimiert und die Expression der E2F-Zielgene *zyklin E*, *zyklin A*, *cdc2*, *DNA-polymerase α* , *dihydrofolatreduktase (dhfr)*, *c-myb*, *c-myc* sowie *E2F* selbst wird verhindert (als Übersicht Bartek et al., 1997). Erst die Phosphorylierung von pRb am Ende der G₁-Phase durch Zyklin D-CDK4/CDK6 oder Zyklin E-CDK2 führt zu der Freisetzung von E2F, zur transkriptionellen Aktivierung der Zielgene und zum Fortschreiten im Zellzyklus (als Übersicht Nevins et al., 1991; Weinberg, 1995).

Die D-Zykline können im Gegensatz zu Zyklin E oder A direkt an pRb binden (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993), wodurch CDK4 in die Nähe seines Substrates gebracht wird. Zyklin D-CDK4 und Zyklin D-CDK6 phosphorylieren bevorzugt pRb, während Zyklin E- und Zyklin A-CDK2 in *in vitro* Experimenten bevorzugt Histon H1 als Substrat benutzen (Matsushime et al., 1994; Meyerson und Harlow, 1994).

Die Durchwanderung des Zellzyklus von der S- in die G₂-Phase und weiter in die Mitose wird hauptsächlich durch die Aktivität der Zyklin A-CDK2- und Zyklin B-CDC2-Kinase-Komplexe reguliert (Desdouets et al., 1995b; Furuno et al., 1999). Dabei ist Zyklin A-CDK2 ein entscheidender Faktor bei der DNA-Synthese und für den Eintritt der Zellen in die Mitose, während Zyklin B-CDC2 für den Ablauf der Mitose, besonders die Auflösung der Kernmembran und den Aufbau der Mitosespindel, wichtig ist (Furuno et al., 1999). Die Mikroinjektion von Antikörpern gegen Zyklin A oder „antisense“-RNA verhindert die DNA-Replikation in Säugetierzellen, während die Blockierung der Zyklin A-CDK2-Aktivität in der Mitose gezeigt hat, daß der Komplex für die Aktivierung und die Translokation von Zyklin B-CDC2 benötigt wird (Girard et al., 1991; Zindy et al., 1992; Furuno et al., 1999).

2.2.2. Die Inhibitoren des Zellzyklus

Die Aktivität der Zykline und ihrer assoziierten Kinasen wird zusätzlich über die sogenannten CDK-Inhibitoren (CKI) kontrolliert. Die CKIs werden aufgrund ihrer Struktur und ihres Bindungspartners in zwei Familien eingeteilt. Die erste Familie beinhaltet die INK4 Proteine („inhibitors of CDK4“), die spezifisch CDK4 und CDK6 inhibieren. Zu ihnen gehören p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} (Serrano, 1997; Hannon und Beach, 1994; Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995; Chan et al., 1995). Sie besitzen mehrere Ankyrin-Domänen und inhibieren spezifisch die Zyklin D-abhängige Kinase-Aktivität, was zur Hemmung der pRb-Phosphorylierung führt und die Zellen in der G₁-Phase arretiert. Neben der INK4-Protein-Familie gibt es die unspezifischeren CKIs der Cip/Kip-Familie. Sie beeinflussen die Aktivität von Zyklin D-, Zyklin E- und Zyklin A-abhängigen Kinase-Komplexen. Zu der Familie gehören p21^{WAF, Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993; Dulic et al., 1994; Polyak et al., 1994; Toyoshima und Hunter 1994; Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995; Deng et al., 1995). Sie besitzen an ihrem aminoterminalen Ende eine Domäne, die es ihnen ermöglicht, Zykline und auch CDKs zu binden (Chen et al., 1995; Chen et al., 1996). Die Mitglieder der

Cip/Kip Familie sind sowohl negative als auch positive Regulatoren. Sie inhibieren Zyklin E- und Zyklin A-Kinase-Komplexe, während sie Zyklin D-Kinase-Komplexe aktivieren können (Sherr und Roberts 1999). Die Transkription des *p21^{Cip1}* Gens wird von dem Protein des Tumorsuppressorgens *p53* induziert (Levine, 1997). *p53* hat im Zellzyklus die Funktion, die intakte Weitergabe der DNA zu gewährleisten. So führt die Einwirkung von DNA-schädigenden Einflüssen zur erhöhten Expression von *p53*, nachfolgend zur Aktivierung von *p21^{Cip1}* und damit zur Arretierung der Zellen am Ende der G_1 -Phase.

Ein Eingreifen in den Zellzyklusablauf und damit eine Veränderung der Proliferation kann auf mehreren Ebenen stattfinden. So kann z.B. eine veränderte Expression von Zyklinen, CDKs und/oder CKIs zu einem unkontrollierten Wachstum von Zellen und als Folge zur Tumorentstehung führen (Lukas et al., 1995).

2.3. Fragestellung

Die Tatsache, daß eine geringe Veränderung der Zellzykluskontrolle zu einer veränderten Proliferation und zur Tumorentstehung beitragen kann, macht es notwendig, die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen im Detail zu untersuchen.

Bisherige Studien haben gezeigt, daß der Transkriptionsfaktor AP-1 entscheidend an dieser Regulation beteiligt ist. Da die einzelnen AP-1-Mitglieder aber spezifische, nicht redundante Funktionen ausüben, ist es wichtig, die Rolle der einzelnen AP-1-Proteine genau zu beschreiben. Die Messung der Gesamtaktivität von AP-1 oder die Untersuchung von bisher bekannten AP-1-regulierten Genen bietet jedoch keine Möglichkeit, den Beitrag der individuellen Proteine zur Regulation der Proliferation und des Zellzyklus zu bestimmen. Auch die Verwendung von transdominant-negativ wirkenden Mutanten erlaubt keine schlüssige Aussage über die Bedeutung eines einzelnen AP-1-Proteins. Das am besten geeignete System zur Untersuchung der spezifischen Funktionen der einzelnen AP-1-Mitglieder im Säugetierorganismus ist das gezielte Ausschalten des jeweiligen Gens in embryonalen Stammzellen der Maus und die nachfolgende Generierung von Embryonen bzw. Mäusen, denen dieses bestimmte AP-1-Mitglied fehlt. Aus solchen defizienten Embryonen können dann primäre Zellen isoliert und nachfolgend immortale Zelllinien, vorwiegend Fibroblasten, etabliert werden.

Bisher ist nur sehr wenig über die Funktion der AP-1-Untereinheit JunB bei der Regulation der Proliferation und des Zellzyklus bekannt. Da JunB hemmend auf das in den Zellzyklus eingreifende Protein c-Jun wirken kann, könnte JunB selbst auch einen bedeutenden Einfluß auf die Proliferation bzw. den Zellzyklus haben. Außerdem wird JunB zusätzlich zu den gleichen Signaltransduktionskaskaden, die den c-Jun-Promotor steuern, durch die Adenylat-Zyklase- und die Smad-Protein-Kaskade reguliert (Jonk et al., 1998). Man kann daher annehmen, daß JunB auch individuelle und spezifische Funktionen in biologischen Prozessen wie der Proliferation hat. Diese Annahme wird noch gestärkt durch die Fähigkeit von JunB, neben seiner oft beschriebenen hemmenden Funktion selbst auch als starker transkriptioneller Aktivator zu wirken (Chiu et al., 1989). Besonders deutlich wird die einzigartige Rolle von JunB innerhalb der AP-1-Familie dadurch, daß die JunB-defizienten Embryonen den frühesten Phänotyp aller AP-1-Untereinheiten zeigen und sich deutlich in ihrem Phänotyp von dem der c-Jun-defizienten Embryonen unterscheiden, obwohl c-Jun das am nächsten verwandte Protein darstellt. Insgesamt betrachtet ist es also durchaus denkbar, daß JunB eine weitere spezifische Verbindung zwischen den Mitogen-aktivierten Signaltransduktionskaskaden und der Zellzyklusregulation darstellt.

Die Analyse der Proliferation in den JunB-defizienten Embryonen ergab keine deutlichen Unterschiede zu den Wildtyp-Embryonen. Allerdings erlaubte der plazentale Defekt der Embryonen nur eine sehr grobe Analyse, die Zellzyklusregulation im Detail zu untersuchen war nicht möglich. Daher sollte in dieser Arbeit die Proliferation und die Zellzyklusregulation in JunB-defizienten Fibroblasten untersucht werden, die aus den defizienten Embryonen abgeleitet wurden. Diese Zellen haben den Vorteil, daß es mit ihnen möglich ist, zellautonome Funktionen zu untersuchen, die nicht auf der Interaktion von verschiedenen Zelltypen basieren, wie es im Gesamtorganismus der Fall sein kann. Mit diesem Ansatz sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Spielt JunB eine Rolle bei der Proliferation und der Zellzyklusregulation ?
- Welche Funktion hat JunB im Zellzyklusablauf ?
- Was sind die kritischen Angriffspunkte (JunB Zielgene) ?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst-möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wäßrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q-Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Allgemein gebräuchliche Chemikalien

Merck, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 Sigma, Deisenhofen

Azetyl-Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Roche, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
2',3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt

EDTA	Merck, Darmstadt
Eichproteine, vorgefärbt	BioRad, München
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylazetat	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Sigma, Deisenhofen
Geneticin-Sulfat (G418)	Gibco, Karlsruhe
Glutathion	Fluka, Buchs
Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glyzin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Histon H1	Roche, Mannheim
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Leupeptin	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Roche, Mannheim
Nukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
Pepstatin	Roche, Mannheim
Poly dI/dC	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Sigma Deisenhofen
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Sephadex G25/G50	Amersham Pharmacia, Freiburg
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TPA	Abt. Hecker, DKFZ
Triton X-100	BioRad, München
tRNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial

Leica-Mikroskop	Leica, Bensheim
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
DC-Platten (Kieselgel-beschichtet)	Macherey-Nagel, Düren
ECL-System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
	BRL, Eggenstein
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme (Curix 60)	Agfa, München
FACScan/FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Geltrockner	BioRad, München
Gene Screen-Membran	NEN Life Science Products, Köln
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1 und JA-1	Beckman, München
Mikrozentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Perkin Elmer Cetus 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk
Phosphoimager (Fuji BAS 1500)	Raytest, Straubenhardt
Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran	Millipore, Bedford
Röntgenfilme (Fuji RX)	Siemens AG, Stuttgart
Spektralphotometer (Gene Quandt pro)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationsmeßgerät (LS5000TD)	Beckman, München
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus, Hanau
Titertek Multiscan PLUS MKII	Labsystems, Finnland
Transferapparat für Western-Blot	BioRad, München
Transilluminator	Stratagene, Heidelberg
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vakuum-Konzentrator („speed vac“)	Bachhofer, Reutlingen
Whatman 3MM Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen

3.1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), New England Biolabs (Frankfurt), Roche (Mannheim), Promega (Madison) oder United States Biochemicals (Cleveland) bezogen.

3.1.4. Radiochemikalien

α - ³² P-dCTP	370 MBq/ml
γ - ³² P-ATP	370 MBq/ml
α - ³⁵ S-dATP	370 MBq/ml
D-threo-(dichlorazetat-1- ¹⁴ C)-Chloramphenicol	7,4 MBq/ml

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

3.1.5. Antikörper

alle unten genannten Antikörper sind gegen Maus-Antigene gerichtet

α Zyklin A	M. Pagano, New York, USA
α Zyklin B	I. Hoffmann, Heidelberg
α Zyklin D1	DCS11 (MS211-P), Neomarkers HD11 (sc-246), Santa Cruz, Heidelberg
α Zyklin E	M20 (sc-481), Santa Cruz, Heidelberg
α CDK2	M2 (sc-163), Santa Cruz, Heidelberg
α CDK4	C22 (sc-260), Santa Cruz, Heidelberg
α CDK6	C21 (sc-177), Santa Cruz, Heidelberg
α CDC2	17 (sc-54), Santa Cruz, Heidelberg
α p53	CM1 und CM5, Medac, Hamburg
α p21	C19 (sc-397) und M19, Santa Cruz, Heidelberg
α p27	15606E (sc-528), Pharmingen, Heidelberg
α p16	M156 (sc-1207), Santa Cruz, Heidelberg
α JunB	N17 (sc-046), Santa Cruz, Heidelberg
α c-Jun	J31920, Transduction Laboratories, Heidelberg

α β -actin	A-2066, Sigma, Deisenhofen
α BrdU	NA20, Calbiochem, Schwalbach
α BrdU-FITC	347583, Becton Dickinson, Heidelberg
α ER	MC20, (sc-542) Santa Cruz, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

3.1.6. Proben für Northern-Blot Analysen

<i>GAPDH</i> :	PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985)
<i>c-jun</i> :	HindIII/PstI-Fragment aus RSV c-Jun (Angel et al., 1988a)
<i>zyklin A</i> :	EcoRI-Fragment aus pXcycA (Pines und Hunter, 1990)

3.1.7. Oligonukleotide für Protein/DNA-Bindungsstudien

mouse TRE (Schorpp et al., 1995)

5'-AGCTAAAGTGGTGACTCATCACTAT-3'

5'-AGCTATAGTGATGAGTCACCACTTT-3'

OCT (Annweiler et al., 1994)

5'-AGAGCTGAGCAAAACACCACCTGGGTAATTTGCATTTCTAAAATAAGTCGA-3'

5'-AGAGTCGACTTATTTTAGAAATGCAAATTACCCAGGTGGTGTGTTTGTCTCAG -3'

mouse CRE zyklina

5'-CTGGTGACGTCACGGA-3'

5'-ACTGCAGTGCCTGAGG-3'

3.1.8. Oligonukleotide für die PCR

<i>junB-B2</i>	5'-GGGAACTGAGGGAAGCCACGCCGAGAAAGC-3'
<i>junB-B10</i>	5'-AAACATACAAAATACGCTGG-3'
<i>junB-3'Not</i>	5'-GTCCAACGTTCCGTTTCGCG-3'
<i>junB-B8</i>	5'-GCAGCCTGTCTCTACACGACTACA-3'

<i>p16-5'</i>	5'-TCCGCTGCAGACAGACTGGCCAG-3'
<i>p16-3'</i>	5'-AGGCATCGCGCACATCCAGC- 3'
<i>β-tubulin-5'</i>	5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'
<i>β-tubulin-3'</i>	5'-GGAACATAGCCGTAAACTGC-3'
<i>ubi-1</i>	5'-CAGACCGTACCGGAGGCACGCAGC-3'
<i>ubi-2</i>	5'-TGGAGATTCAAGTCCCCAAAGCC-3'
<i>cycaprom-5'</i>	5'-AAACTCTGGGATTAAAGGTATGTA-3'
<i>cycaprom-3'</i>	5'-TGGCGCCAGTTTTTCGGGGTTGA-3'

3.1.9. Nährmedien für die Bakterienkultur

PSI-Medium:	2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,4% MgSO ₄ ; 10 mM KCl; pH 7,7
TY-Medium:	1% Bacto-Trypton; 1% Hefeextrakt; 0,1% Casamminosäuren; 5% NaCl
SOB-Medium:	2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium:	SOB + 20 mM Glukose

Bakterienplatten wurden durch Zugabe von 15 g Bacto-Agar/Liter Medium hergestellt.

3.1.10. Lösungen und Puffer

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl ₂ ; 0,6 mM MgCl ₂ ; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,6
20x SSC:	3 M NaCl; 0,25 M Na-Citrat; pH 6,5
TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE:	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

3.1.11. Bakterienstämme

E. coli DH5α

Genotyp:	F-, Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>)U169
----------	---

E. coli XL1 blue

Genotyp: F':::Tn10 *proAB*+*lacI*^q Δ*ZM15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*,
(*Nal*^r), *thi*, *hsdR17* (*r*_K⁻, *m*_K⁺), *supE44*, *relA1*, *lac*

3.1.12. ZellenF9

undifferenzierte Maus-Teratokarzinom-Zellen aus einem Testis-Teratokarzinom einer Maus des Stammes 129 (Berstine et al., 1973)

Maus-Wildtyp-Fibroblasten

3T3-7, 3T3-14

nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963) immortalisierte Maus-fibroblasten; von Andrea Kolbus zur Verfügung gestellt; in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp Fibroblasten bezeichnet

Maus-Fibroblasten ohne funktionelles JunB

3T3-1, 3T3-10

nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963) immortalisierte Maus-fibroblasten; von Andrea Kolbus zur Verfügung gestellt; in der vorliegenden Arbeit als JunB-defiziente (*junB*^{-/-}) Fibroblasten bezeichnet

Maus-Fibroblasten mit stabil transfiziertem JunB-ERTM

junB^{-/-} / *junB-ER*TM

Zur Herstellung eines *junB-ER*TM Expressionsvektors wurde zunächst das Stopcodon in *junB* mit Hilfe eines DNA-Fragments bestehend aus 2 Oligonukleotiden (Sequenz Oligo1: 5'-acggctgccagttgctgctaggggtcaaggacacgccttc-3'; Oligo2: 5'-gtctggactcgaggatccccgaaggcgtgtcccttgaccc-3') in einem 3' Subklon von *junB* (323 Basenpaar BssHII-XhoI Fragment, Schorpp-Kistner, unveröffentlicht) zwischen den Schnittstellen AlwNI und XhoI ersetzt. Das komplette *junB*-cDNA Fragment wurde aus *ubi-junB* (Schorpp et al., 1996) mit SmaI ausgeschnitten, mit EcoRI-Linker versehen und in die EcoRI-Schnittstelle von pBluescript SK (Stratagene, Amsterdam) kloniert. Das endgültige *junB-ER*TM Konstrukt wurde durch Ligation aus folgenden 4 Fragmenten hergestellt: 5'-Bereich: EcoRI/BspHI-Fragment aus

der kompletten *junB*-cDNA in pBluescript SK; 3'-Bereich mit dem ersetzten Stopcodon: BspHI/BamHI-Fragment; BamHI/EcoRI- *ERTM*-Fragment aus *pMV7-c-jun-ERTM* (Bossy-Wetzel et al., 1997); EcoRI geschnittener pBluescript SK. Das so erhaltene *junB-ERTM* Fragment wurde als XbaI/SalI-Fragment isoliert und in einen XbaI/XhoI geschnittenen *ubi-junB*-Expressionsvektor (Schorpp et al., 1996) eingesetzt. Zur Herstellung eines zusätzlichen Rous-Sarkoma-Virus Promotorkonstruktes (RSV) wurde der Ubiquitin C (Ubi) -Promotor gegen den RSV-Promotor ausgetauscht. Die *junB^{-/-}*-Fibroblasten wurden mittels Lipofektion (Lipofectamin; Gibco BRL, Karlsruhe) entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit 2,8µg *ubi-junB-ERTM* bzw. *RSV-junB-ERTM* und 0,4µg *pSV-Hygro* (Schorpp-Kistner, unveröffentlicht) kotransfiziert. Nach 3 Wochen auf Selektionsmedium (DMEM mit 10% FCS und 50-100µg/ml Hygromycin B, Sigma) wurden individuelle Zellklone isoliert und expandiert.

Maus-Fibroblasten mit überexprimiertem JunB

ubi-JunB

Mit einem Expressionsvektor für JunB unter der Kontrolle des Ubiquitin C - Promotors (Ubi) stabil transfizierte Wildtyp-Fibroblasten (von Dr. Bettina Hartenstein zur Verfügung gestellt).

3.2. DNA-Methoden

3.2.1. Allgemeine DNA -Techniken

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Einer $OD_{260} = 1$ entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA.

Zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wurde außerdem die OD bei 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,6 und 2,0 kann die DNA ohne weitere Reinigung verwendet werden.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde nach Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) gut gemischt. Zur Phasentrennung wurde 3 min bei 10000 x g und RT zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Das Präzipitat wurde bei 10000 x g, 10 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden die Zellen trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte über Nacht in 500 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 25 µl 10 mg/ml Proteinase K) bei 55°C. Am nächsten Tag wurden 200 µl 6 M NaCl zugegeben, 5 min gemischt und für 7 min bei 10000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und für 3 min bei 10000 x g und RT zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Plasmid DNA Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer 1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl alkalischer Lösung (0,2 M NaOH; 1% SDS) und Mischen wurden 100 µl 3 M Natriumazetat (pH 4,8) zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform- Extraktion. Aus dem Überstand wurde mit 1 ml Ethanol die Plasmid-DNA präzipitiert (5 min bei Raumtemperatur) und durch 10 min Zentrifugation bei 10000 x g sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

Plasmid-DNA Maxi-Präparation mittels Ionenaustauscher-Säulen-chromatographie

200 ml Selektionsmedium (TY + 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien-suspension wurde 10 min bei 4000 x g sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml P3 (3 M Kaliumazetat pH 4,8) neutralisiert (10 min auf Eis), bei 4°C und bei 2000 x g 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von „Quiagen-tip-500“ Säulen (Quiagen Inc.) laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, bei 10000 x g und RT pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, das Präzipitat im Vakuum getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einer wäßrigen DNA-Lösung wurden durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen die Bedingungen für die jeweilige Restriktionsendonuklease entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für 1-2 h.

Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit 1 µl alkalischer Phosphatase (2 U/µl) in einem Endvolumen von 50 µl CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9,0; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM ZnCl₂; 1 mM Spermidin) versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei 5'-überhängenden Enden durch 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde erneut 1 µl Enzym (2 U/µl) zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA.

Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern

Etwa 2 µg Oligonukleotid- oder Linker-DNA wurden mit 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) in einem Endvolumen von 10 µl mit Kinase-Puffer (66 mM Tris pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 15 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0,2 mg/ml BSA) versetzt. Die Reaktion erfolgte eine Stunde lang bei 37°C und wurde durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt.

Auffüllen von 5'-Überhängen, Abbau von 3'-Überhängen

Die DNA wurde mit 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP; dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5), 2 µl 10 x Polymerasepuffer (70 mM Tris pH 7,5; 70 mM MgCl₂; 500 mM NaCl) und 1 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl versetzt. Nach 30 min Reaktion bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 µl 10 x Ligationspuffer (50 mM Tris pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl 4 h bei 16°C inkubiert.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden, je nach Größe der zu trennenden Fragmente, horizontale Agarosegele mit 0,4% bis 2% Agarosegehalt eingesetzt. Die entsprechende Agarosemenge wurde dafür in TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, verdampftes Wasser ersetzt und Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde das Gel in das Gelbett mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 1/10-Volumen 10x Auftragungspuffer (25% (w/v) Ficoll 400, 0,25% (w/v) Bromphenolblau und 0,25% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die ausgesparten Geltaschen aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnten die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Durchlicht sichtbar gemacht, die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) aufgereinigt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 6-10% -ige Polyacrylamidgele verwendet. Für ein 6% -iges Gel benötigt man 6 ml einer deionisierten Acrylamid: Bisacrylamid (30 : 0,8) Stammlösung, die mit 3 ml TBE und 21 ml Wasser versetzt wird. Nach Zufügen und Mischen von 25 µl TEMED und 150 µl Ammoniumpersulfatlösung (10%) wurde das Gel zwischen zwei 14 x 15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach Polymerisieren der Gellösung wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser ausgespült. Die Gelplatten wurden senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur gespannt und als Elektrodenpuffer 1xTBE (90 mM Tris pH 8,3; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,0) eingefüllt. Nach Auftragen der Proben in Glyzerin-Puffer (10 mM EDTA pH 8,0; 10% Glyzerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau) erfolgte die Auftrennung bis zum Einwandern der Proben ins Gel bei 100 V, danach bei 240 V. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten getrennt und 15 min unter leichtem Schütteln in 200 ml Wasser mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht.

Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Die Auftrennung von DNA-Molekülen unter denaturierenden Bedingungen, z.B. nach der DNA-Sequenzierung, erfolgte mit Hilfe der Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese. Die entsprechenden Gele wurden mit einer Dicke von 0,2 mm zwischen zwei 20 x 40 cm große Glasplatten gegossen. Dazu wurden 30 ml Gellösung (100 ml deionisiertes Acrylamid: Bisacrylamid (30 : 0,8), 50 ml 10xTBE, 250 g Harnstoff, auf 500 ml mit H₂O aufgefüllt) mit 30 µl TEMED und 300 µl 10% APS (w/v) versetzt, gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelapparatur eingespannt und die Kammern mit 1xTBE gefüllt. Für eine optimal denaturierende Wirkung des

Harnstoffs ist eine Temperatur von ca. 60°C notwendig. Daher wurde ein halbstündiger Vorlauf des Gels bei 1400 V durchgeführt bevor die Proben aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 1400 V. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel auf Whatman-Papier der entsprechenden Größe transferiert, bei 80°C getrocknet und über Nacht bei RT gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR)

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem „Perkin-Elmer-Cycler“ (Norwalk, USA): 1/10 Volumen 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM MgCl₂), 1/10 Volumen 10 x dNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10 x Primer (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (als Faustregel gilt, daß die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann). Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

3.2.3. Sequenzierung von DNA

Gereinigte Plasmid-DNA wurde mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977) mit Hilfe des „T7-Sequense-Kit“ der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 0,2 mM EDTA; 0,2 M NaOH denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit 2,5 ng des entsprechenden Sequenzier-Oligonukleotids gemischt, auf 65°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit α-³⁵S-dATP erfolgt die Kettenabbruch-Reaktion mit den entsprechenden Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7,8; 99%

Formamid; 0,03% Xylencyanol; 0,03% Bromphenolblau) und 3 min Kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamid / 8,3 M Harnstoff-Gel aufgetrennt.

3.2.4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Sondenherstellung wurde die „Random Primer“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) benutzt. Hierbei wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen aufgeschmolzen und das Anhybridisieren kurzer zufälliger DNA-Sequenzen an die resultierenden Einzelstränge erlaubt. Die anhybridisierten Stücke dienen als Startstelle für die nachfolgende DNA-Verlängerung durch das Klenow-Fragment aus der DNA-Polymerase I von *E.coli*. Durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotid-Triphosphate werden die entstehenden Doppelstränge radioaktiv markiert. Verwendet wurde das Protokoll des „rediprime-Kits“ der Firma Amersham: 10-20 ng DNA-Fragment wurden in einem Volumen von 45 µl durch 5 minütige Inkubation bei 100°C denaturiert, auf Eis 5 Minuten abgekühlt und in ein „rediprime“-Röhrchen gegeben. Dieses enthält ein Lyophilisat aus Desoxynukleotidtriphosphaten, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Nach Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 10 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Zur Trennung des markierten Fragments von nicht eingebauten Nukleotiden wurde der Ansatz über eine Sephadex-G50-Säule geleitet (Gelfiltration). Die Pakung dieser Säule mit in TE äquilibriertem Sephadex-G50 und die chromatographische Auftrennung von Fragment und freien Nukleotiden erfolgte unter Zentrifugation bei 800 x g für jeweils 4 min. Anschließend wurde 2x mit je 100 µl TE pH 8 gewaschen. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide wurde durch Messen von 2 µl des Eluates im Szintillationszähler (LS5000TD, Beckman) bestimmt.

Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Diese Art der Markierung wurde für Oligonukleotid-DNA verwendet, die in DNA/Protein-Bindungsstudien eingesetzt wurden. Zur Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden wurden jeweils 10 µg komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide in 0,5x TBE 5 min auf 95°C erhitzt und danach langsam in einem

mit Wasser gefülltem Becherglas auf RT gebracht. Das weitere Abkühlen auf 4°C erfolgte über Nacht im Kühlraum. Die Konzentration der nun doppelsträngigen Nukleotide wurde auf 1 pmol/µl eingestellt.

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide erfolgte mittels Kinasierung. Dazu wurden 2 pmol Nukleotide mit 1/10 Volumen 10 x Kinase-Puffer (700 mM Tris pH 7,5, 70 mM MgCl₂), 3 µl γ-³²P-ATP und 8 U T4-Polynukleotid-Kinase 45 min bei 37°C inkubiert. Die Trennung von nicht eingebautem ATP erfolgte mittels Gelfiltration (Säule, Amersham).

3.2.5. Transformation von DNA in *E.coli* Bakterien

Herstellung chemo-kompetenter *E.coli* Bakterien

Der Bakterienstamm *E.coli* XL1blue wurde auf einer Agarplatte mit TY-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6 ml Kultur (PSI-Medium) angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀=0,28 inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 100 ml PSI-Medium wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀=0,48 inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien wurden diese in 10 ml eiskaltem, sterilfiltriertem TFB1-Puffer (100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kaliumazetat; 10 mM CaCl₂; pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt) aufgenommen und für 3 h auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert (4000 x g), in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂; 15% Glycerin) resuspendiert und in 50 µl Aliquots abgefüllt. Die schockgefrorenen Bakterien (2 min flüssiger Stickstoff) wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut.

Transformation kompetenter Bakterien

50 µl kompetente Bakterien wurden mit Plamid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min und Inkubation für 5 min auf Eis, wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Kultur für 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte (1,5% Bacto-Agar in TY-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

3.3. RNA-Methoden

3.3.1. Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski u. Sacchi, 1987)

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 ml Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl, 0,1% Antifoam, 100 mM β -Mercaptoethanol) versetzt. Die so lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst und mittels einer Injektions-spritze nach mehrmaligem Auf- und Abziehen, zur Scherung der genomischen DNA, in ein steriles 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 μ l 2 M Ammoniumazetat (pH 4,0) wurde mit 2 ml wassergesättigtem Phenol gut ausgeschüttelt, danach wurden 400 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und erneut geschüttelt (ca. 1 Minute). Nach einer Inkubation von 10 min bei 4°C wurde das Gemisch abzentrifugiert (10000 x g; 20 Minuten; 4°C), die wäßrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die RNA wurde ca. 1 h bei -20°C gefällt und erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem Ethanol (80%) getrocknet, in 100 μ l DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration bestimmt.

3.3.2. RT-PCR

Jeweils 1-2 μ g denaturierte Gesamt-RNA (70°C für 3 min) wurde in einem Volumen von 20 μ l mit den Oligonukleotid-Primern „Oligo dT“ (Gibco) wie folgt revers transkribiert: 5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM Desoxynukleotid-triphosphate, 50 pmol Primer, 2,5 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 1,7 U RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 40 min bei 41°C und 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In der daran anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, cDNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem „Hybaid-Cycler“ (Biozym, Hess. Oldendorf): 1/10 Volumen 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM $MgCl_2$), 1/10 Volumen 10 x dNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10 x Primer (100 pmol), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen (20-25 μ l) aufgefüllt. Die De-

naturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur für 1 min und die DNA-Synthese bei 72°C für 1-2 min. Die Amplifikationsprodukte (nach 30-35 Zyklen) wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

3.3.3. Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung der RNA wurden horizontale Gelkammern verwendet. Dazu wurden 3,5 g gelöste Agarose mit 5 ml 50x MOPS (400 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure), 100 mM Na-Azetat, 10 mM EDTA, pH 8), 5 ml 37% Formaldehyd und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 250 ml Wasser in das Gelbett mit Kamm gegossen. 20-30 µg Gesamt-RNA wurden in der „SpeedVac“ eingetrocknet, in 15 µl Denaturierungspuffer (54% Formamid, 18% Formaldehyd (37%), 1 x MOPS, 0,4% Bromphenolblau) gelöst, 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung.

3.3.4. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht fotografiert und die 18S- und 28S-RNA markiert. Das Gel wurde auf einer Glasplatte plaziert, worauf sich 3-MM-Papier, mit 10 x SSC getränkt, befand. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Nylon-Membran (Gene Screen plus) gelegt, auf diese wiederum 3-lagig 3-MM-Papier (ebenfalls mit 10 x SSC getränkt), über welches ein Kleenex-Stapel, der mit Gewicht beschwert wurde, geschichtet wurde. Über Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht; anschließend wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und danach bei 80°C eine Stunde inkubiert. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Membran, wurde die Membran zusätzlich mit UV C (254 nm, 1.200 Joule) bestrahlt.

3.3.5. Hybridisierung der RNA

Nach der kovalenten Fixierung der RNA an die Membran wurde diese in einer Röhre mit 5 ml Hybridisierungslösung (1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer, 7% SDS) in einem Ofen bei 65°C unter Rotation prähybridisiert. Danach wurden ca. $1-3 \times 10^7$ cpm radioaktiv-markierter Probe, die zuvor 20 min mit 30% 2N NaOH bei RT denaturiert wurde, dazupipettiert. Die Hybridisierung erfolgte bei einer ho-

mologen Sonde bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotieren der Röhre wie folgt mit 20 mM Phosphatpuffer; 1% SDS gewaschen: 1x 5 min, dann 2x5 min und 1x 20-40 min. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet. Sollte eine Membran nach Hybridisierung mit einer anderen Probe hybridisiert werden, so wurde die ursprüngliche Probe durch 10 minütige Inkubation in kochender 0,1% SDS /2 mM-EDTA Lösung entfernt. Die erneute Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

3.4. Protein-Methoden

Zur Verhinderung von Protease- und Phosphataseaktivitäten wurden, wenn nicht anders angegeben, sämtliche Arbeiten mit Proteinen, deren Isolierung eingeschlossen, stets auf Eis mit kalten Lösungen oder im Kühlraum durchgeführt. Zusätzlich wurden dem Lysispuffer Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden in einer Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt.

3.4.1. Herstellung von Proteinextrakten

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen kultiviert und anschließend je nach Gebrauch geerntet. Zur direkten Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Zellen nach Waschen mit PBS direkt im Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β -Mercaptoethanol) lysiert und nach Denaturierung bei 100°C auf das Gel aufgetragen. Zur Detektion von Immunkomplexen wurden die Zellen in dem jeweiligen Lysispuffer geerntet, wonach eine Bestimmung der Proteinkonzentration stattfand.

3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry et al., 1951)

Für die Erstellung der Eichkurve wurden 5 bis 40 μ l einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml, gelöst in Lowry-Lösung I) und 5 μ l 250 mM Tris-HCl pH 7,5 (oder der jeweilige Lysispuffer) mit Lowry-Lösung I (2% Na_2CO_3 , 0,1 M NaOH) auf 150 μ l aufgefüllt und mit 250 μ l frisch hergestellter Lowry-Lösung IV (10 ml Lowry-Lösung I mit 100 μ l 2% NaK-Tartrat und 100 μ l 1% CuSO_4) gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 30 μ l 50% Folin-Reagens zugegeben und 60 min im Dunkeln inkubiert. Von den zu bestimmenden Proteinextrakten wurden

jeweils 5 µl mit 145 µl Lowry-Lösung I und 250 µl Lowry-Lösung IV gemischt, wobei nach Zugabe von 50% Folin-Reagens ebenfalls im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Von den so hergestellten Eichkurven- und den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die OD der Farbreaktion im „Elisa-Reader“ der Firma Titertek („Multiskan PLUS MK II“) bei 600 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Eichkurve.

3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei richtete sich der Vernetzungsgrad im Trenngel nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins. Hierfür wurde die entsprechende Acrylamid-Lösung (Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid; 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED) zwischen zwei mit Abstandhaltern fixierte Glasplatten (0,75-1,5 mm dicke Abstandhalter) luftblasenfrei bis ca. 4 cm zum oberen Glasrand ausgegossen, mit Isopropanol überschichtet und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Entfernen des Gelüberstandes wurde das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt. Bei der Denaturierung der Proben im Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β-Mercaptoethanol) wird die Eigenladung der denaturierten Proteine vollständig durch die negativen Ladungen der SDS-Sulfatgruppen überlagert, so daß im elektrischen Feld die Mobilität der SDS-Proteinkomplexe weitestgehend durch den Siebeffekt der Polyacrylamidmatrix bestimmt wird. Dadurch wird eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erreicht. 30 bis 50 µg Proteinextrakt (je nach nachzuweisendem Protein) wurden mit Lysispuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt und mit 5 µl 5x Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 4 min bei 100°C denaturiert und kurz anzentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer gut gespült und die Proben mit einer Hamilton-Spritze direkt in die Geltaschen gegeben. Der Sammelgellauf erfolgte bei konstanten 20 mA in 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS), der Trenngellauf erfolgte je nach Größe und Auftrennung des gewünschten Proteins bei konstanten 30 mA für 2-3 h. Der Gellauf wurde beendet,

sobald die entsprechenden blau-markierten Molekulargewichtsmarker eine gute Auftrennung aufwiesen. Das Gel wurde zwischen den beiden Glasplatten entfernt und entweder Coomassie-gefärbt, geblottet („Western-Blotting“) oder in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm exponiert.

3.4.4. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen

Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, können durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel 30 min in 0,5 ml/cm² Gelfläche Färbelösung (0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure) und danach so lange in Entfärbelösung (50% Methanol; 7,5% Essigsäure) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

3.4.5. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Der Transfer der im Polyacrylamidgel immobilisierten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Western-Blot-Apparatur (BioRad) in der folgenden Weise: Das in der Reihenfolge aus Schwamm, 3 Lagen 3-MM Papier, Trenngel, Nitrocellulose-Membran, 3 Lagen 3-MM Papier, Schwamm, luftblasenfrei zusammengesetzte Sandwich wurde mittels Trägers senkrecht in die mit Western-Blotting-Puffer (20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) gefüllte Elektrophoresekammer gebracht. Zuvor wurde die Membran 2 min in Western-Blotting-Puffer äquilibriert, das 3-MM Papier in Western-Blotting-Puffer getränkt und das Gel 2 min in Western-Blotting-Puffer gewaschen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte unter ständigem Rühren des Puffers über Nacht bei 4°C bei einer Spannung von 30 Volt.

Nach Abbau des Sandwiches wurde die Membran 2x 10 min in TBS (20 mM Tris-Base, 137 mM Natriumchlorid; pH 8,1) gewaschen. Danach wurde die Membran 30 min in Blockierungs-Puffer (4% (w/v) Magermilchpulver 0,5% Tween 20 in TBS) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation des jeweiligen Antikörpers (meist 1:1000 verdünnt in Blockierungs-Puffer) erfolgte mindestens 2 h in einer Folie eingeschweißt und unter Rotieren bei RT. Dann wurde die Membran mit Blockierungs-Puffer gewaschen (3x 5 min) und mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper (1:2.500 verdünnt) mindestens

1 h inkubiert. Der erste Waschschriff erfolgte mit Blockierungs-Puffer, die folgenden 4 mit TBS. Schließlich wurde die Membran nach Abtropfen auf der Proteinseite mit 6 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung der beiden ECL-Detektionslösungen (Amersham Pharmacia, Freiburg) genau 1 min bedeckt, die Flüssigkeit mit einem Kleenex-Tuch vom Rand her abgesaugt und die Membran, bedeckt mit einer Frischhaltefolie, in eine Filmkassette gelegt. Auflegen des Filmes erfolgte erst für eine Minute und dann, je nach Signalintensität, kürzer oder länger. Das Detektionssystem basiert auf der von Chemolumineszenz begleiteten Oxidation eines zyclischen Diacylhydrazides, die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird.

3.4.6. Immunpräzipitation von Proteinen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und auf Eis in 0,5-0,8 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 125 mM NaCl; 0,5% NP-40; 0,5% NaDOC; 0,1% SDS; 0,5 mM PMSF; je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin) lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben in Mikrozentrifugenröhrchen überführt, kurz gemischt und durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 10000 x g, 4°C). Die Überstände wurden in Gegenwart von Protein A-Sepharose (25 µl gepacktes Volumen) und 0,5 µg des entsprechenden Antikörpers für 2 h bei 4°C rotiert. Die an die Sepharose gekoppelten Antigen/Antikörperkomplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren (5 s, 10000 x g, 4°C) pelletiert und dreimal mit je 1 ml RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Vor Zugabe von 20 µl Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β-Mercaptoethanol) wurde die Sepharose mit einer Kanüle trockengesaugt. Die Proben wurden 5 min aufgekocht und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel entsprechender Konzentration aufgetrennt.

3.4.7. *in vitro* Kinase-Aktivitätsbestimmung

Zur Herstellung des Proteinextraktes wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl kaltem Lysis-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 10% Glycerol; 1 mM DTT; 0,1% Tween; 10 mM β-Glycerophosphat; 1 mM NaF; 0,1 mM Na₃VO₄; 0,1 mM PMSF; je 2 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin) aufgeschlossen. Der Extrakt wurde in Mikro-

zentrifugenröhrchen überführt, schockgefroren, aufgetaut und 1h auf Eis inkubiert. Zur Beseitigung der Zelltrümmer wurde der Extrakt 10 min bei 4°C und 10000 x g zentrifugiert.

Gleiche Proteinmengen wurden mit 1,5 µl des gewünschten Antikörpers in einem Volumen von 700 µl bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach einer Stunde wurden je Ansatz etwa 20 µl in Lysis-Puffer gequollene Protein A- oder G-Sepharose zugegeben und erneut 2 h bei 4°C rotiert. Die über die spezifischen Antikörper an die ProteinA/G-Sepharose gekoppelten Immunkomplexe wurden zweimal mit 300 µl Lysis-Puffer und einmal mit 300 µl Kinase-Puffer (20 mM MgCl₂; 10 mM EGTA; 40 mM HEPES, pH 7,9) gewaschen. Zur Bestimmung der Kinase-Aktivität wurde eine Kinase-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden 2 µg des entsprechenden Substrates (Histon H1, GST-pRb) und 5 µCi γ-³²P-ATP in einem Endvolumen von 20 µl in Kinase-Puffer mit dem Immunkomplex gemischt und 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz anzentrifugiert, der Überstand mit dem phosphorylierten Substrat in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β-Mercaptoethanol) überführt und 5 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 10-12%-SDS-Polyacrylamidgel wobei auf das Gel nach dem Trocknen ein Röntgenfilm aufgelegt wurde.

Erfolgte die Exposition auf „Imaging“-Platten (FujiphotoFilm Co, LTD), so wurde die quantitative Auswertung mit Hilfe des Programms TINA (Raytest, Straubenhardt) anhand der im „Bio-Imaging Analyser“ (Fa. Fuji: FUJI BAS 1500) gelesenen „Imaging“-Platte durchgeführt.

3.4.8. Bestimmung der Chloramphenicol-Azetyltransferase-Aktivität

(„CAT-Assay“)

Die Zellen einer Zellkulturschale (10 cm) wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einem Gummispatel in 1 ml PBS abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 5000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl Tris-HCl (0,25 M; pH 7,8) resuspendiert. Durch dreimaliges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C wurden die Zellen aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 x g für 10 min ab-

zentrifugiert. Der Überstand mit den zellulären Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt nach der Methode von Lowry bestimmt.

Zur Messung der spezifischen Enzymaktivität wurden gleiche Proteinmengen in 80 µl Tris (0,25 M; pH 7,8) mit 2 µl ^{14}C -Chloramphenicol (Substrat) und 20 µl Azetyl-Coenzym-A (Azetylgruppen-Donor) gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,8 ml Ethylazetat. Das Chloramphenicol und seine azetylierten Produkte werden durch starkes Mischen extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (5 min; 10000 x g) getrennt und die Ethylazetat-Phase abgenommen. Das Ethylazetat wurde im Vakuumkonzentrator eingetrocknet, das Pellet in 20 µl Ethylazetat aufgenommen und punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch aufsteigende Chromatographie mit Chloroform/Methanol (9:1). Nach etwa 45 min wurde die DC-Platte getrocknet und ein Röntgenfilm bei RT exponiert.

Nach Entwicklung des Autoradiogramms konnten die Signale auf dem Röntgenfilm den Positionen der azetylierten Formen des Chloramphenicols auf den DC-Platten zugeordnet werden. Das nicht-azetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am langsamsten. Die 1'-azetylierten, 3'-azetylierten und 1',3'-azetylierten Formen sind polarer und wandern deshalb schneller. Durch Quantifizierung des azetylierten und nicht-azetylierten Anteils des Chloramphenicols kann die Aktivität des CAT-Enzyms berechnet werden.

3.4.9. Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen

Eukaryontische Proteine können durch Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden (Smith und Johnson, 1988). Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine milde Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellen Rohlysaten mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion.

Eine Übernachtskultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wurde 1:10 mit LB-Medium (10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1 l mit H_2O und 100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bei 30-37°C unter Schütteln inkubiert.

Nach 2 h wurden die Bakterien zur Produktion des GST-Fusionsproteins mit 0,1 mM IPTG (f.c.) behandelt und 4 weitere Stunden unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (2000 x g, 10 min, 4°C) sedimentiert, in eiskaltem Puffer E (50 mM HEPES pH 7,9; 15 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) suspendiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Die bakterielle DNA wurde mechanisch im Ultraschall geschert. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (8000 x g; 15 min; 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in PBS gequollener Glutathion-Agarose für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert (die Menge ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat 1 ml gequollene Glutathion-Agarose die Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein). Die Glutathion-Agarose wurde mit dem gebundenen Fusionsprotein in eine Säule transferiert und mit dem Zehnfachen des Säulenvolumens an PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch 5 mM reduziertes Glutathion (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) in Fraktionen aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch eine Proteinbestimmung nach Lowry und anschließend durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.4.10. Protein/DNA-Bindungsstudien (EMSA)

Zur Herstellung der Kernextrakte wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS von den Gewebekulturschalen abgeschabt und 5 min bei 2500 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet (ca. 1x10⁶ Zellen) wurde in 100 µl CE-Puffer (10 mM HEPES pH 7,9; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,5% NP-40; 1 mM PMSF) aufgenommen und zur Lyse der Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden 5 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Der Überstand (Zytoplasma-Extrakt) mit 50 µl NE-Puffer (250 mM Tris pH 7,8; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) versetzt und nach einer erneuten Zentrifugation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kerne (das Pellet) wurden nach Waschen mit CE-Puffer ohne NP-40 unter dem Mikroskop überprüft, um anschließend wieder 5 min zentrifugiert zu werden. Das Kernpellet wurde in 100 µl NE-Puffer aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 15 min Zentrifugation bei 10000 x g abgetrennt. Die Konzentration der

Proteine wurde nach Lowry bestimmt. Die DNA-Bindungsreaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 2-5 µg Kernextrakt mit 4 µl 5x Reaktionspuffer (20% Glycerin; 60 mM Hepes pH 7,9; 25 mM MgCl_2 ; 29 mM Tris HCl pH 7,9; 3 mM DTT; 3 mM EDTA), 1 µg Poly dI/dC und 2 µg BSA auf Eis gemischt und 5 Minuten bei RT stehen gelassen. Nach Zugabe von 2 µl markierter Oligonukleotid-DNA (10 fmol) erfolgte die Komplexbildung 30 min bei RT. Wurden zum Nachweis der Komplexe Antikörper verwendet, so wurden diese mit dem Proteinextrakt und den anderen Bestandteilen eine Stunde auf Eis vorinkubiert, bevor die markierte Probe hinzugefügt wurde (wie oben beschrieben). Die Auftrennung der Komplexe erfolgte in einem 4% Polyacrylamid-Gel in 0,5 x TBE bei konstanter Stromstärke, wobei das Gel 60 Minuten vorlaufen sollte. Nach Trocknen des Geles wurde ein Film aufgelegt.

3.4.11. Luziferase- und LacZ-Bestimmung

Die Zellen einer Zellkulturschale (10 cm) wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einem Gummispatel in 1 ml PBS abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 3500 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 50-100 µl Extraktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat pH 7,6; 0,2% Triton-X-100; 1 mM DTT) resuspendiert und zur Zellyse 5 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den zellulären Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Messung der Luziferase- und der LacZ-Aktivität eingesetzt.

Luziferase Aktivität:

5-10 µl Proteinextrakt wurden mit 50 µl Luziferasepuffer (Promega) gemischt und im Luminometer (Promega) gemessen.

LacZ Aktivität:

20-30 µl Proteinextrakt wurden mit 250 µl LacZ Reaktionspuffer (100 mM Natriumphosphat pH 7,4; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 0,35 % β -Mercaptoethanol) und 50 µl ONPG Lösung (4mg ONPG/ml 100 mM Natriumphosphat pH 7,0) gemischt und bei 37°C bis zu einer deutlichen Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 125 µl 1M Na_2CO_3 gestoppt und anschließend bei 405 nm im Photometer gemessen.

3.5. Zellkultur

Die Maus-Fibroblasten wurden routinemäßig in DMEM mit 10% FCS auf Plastikschalen kultiviert, auf denen sie adhärent wuchsen. Die Inkubation fand im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ statt.

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitsbank der Klasse 2 (Baker) durchgeführt.

3.5.1. Trypsinieren von Zellen

Bei 80% Konfluenz, wurden die Zellen, unter Verdünnung, in neue Schalen transferiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin überschichtet und bis zum beginnenden Ablösen bei 37°C oder RT inkubiert (ca. 5 min). Durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (300 x g, 3 min) sedimentiert und nach Absaugen des Überstands in einem entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer oder mit Hilfe des Coulter Zählgerätes Z2 (Beckman Coulter). Danach wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausplattiert.

3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert und gezählt, die Zellsuspension in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt und in diesem für 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment (ca. 1x10⁶ Zellen) in 1 ml Einfriermedium (20% FCS-Medium + 10% DMSO) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen transferiert. Die Zellen wurden anschließend für 1,5 h auf Eis inkubiert, dann auf -80°C gebracht (unter diesen Bedingungen können die Zellen bis zu 2 Monate aufbewahrt werden). Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen schnell auf 37°C erwärmt, in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium überführt, 3 min bei 300 x g sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes in Medium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

3.5.3. Synchronisation der Zellen in der G₀/G₁-Phase

Die Synchronisation von Zellen in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus erfolgte durch Kultivierung in 0,5%-igem Medium für 48 h. Diese Art von Kultivierung führt zu einer effizienten reversiblen Arretierung der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus. Die Aufhebung der Blockierung und der damit induzierte synchrone Durchlauf der Zellen durch die anschließenden Zellzyklusphasen erfolgte durch Stimulation mit 20% FCS-haltigem Medium.

3.5.4. Synchronisation der Zellen in der S-Phase

Die Synchronisation von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus erfolgte durch einen sogenannten doppelten Thymidin-Block (Thomas und Lingwood, 1975). Bei dieser Methode werden die Zellen bei 37°C und 6% CO₂ zweimal hintereinander mit 2 mM Thymidin inkubiert, unterbrochen von einer Wachstumsphase in DMEM mit 10% FCS. Die Aufhebung der Blockierung und der damit induzierte synchrone Durchlauf der Zellen durch die anschließenden Zellzyklusphasen erfolgte durch Stimulation mit 10% FCS-haltigem Medium.

3.5.5. Behandlung der Zellen mit TPA

Die Behandlung der Zellen mit TPA erfolgte durch Zugabe der Stammlösung (200 µg/ml TPA in DMSO, die bei -20°C aufbewahrt wurde) in den gewünschten Endkonzentrationen ins serumhaltige Medium. Die Zellen wurden je nach Bedarf im Brutschrank inkubiert.

3.5.6. Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen

12 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsinisiert und in einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen pro 10 ml Medium in einer 10 cm-Petrischale eingesät. Für den Transfektionsmix wurden 5 - 15 µg DNA in 250 mM CaCl₂ gelöst und dann Tropfen für Tropfen mit dem gleichen Volumen 2 x HBS (280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O; 50 mM HEPES) gemischt. Nach 20 min wurde das Kalziumphosphat/DNA-Präzipitat, über die Zellen verteilt, ins Medium getropft. Die Zellen wurden 5 h lang im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je ca. 5 ml PBS (Entfernen des Präzipitates) wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen für weitere 5 h im Brutschrank inkubiert.

3.6. FACS-Analyse

Die FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“)-Analyse ermöglicht die Detektion von Zellen oder deren DNA-Gehalt anhand von Fluoreszenzmarkierungen. Hierbei werden einzelne Zellen enthaltende Tröpfchen der markierten Zellsuspension mit Laserlicht angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Zudem gestatten Beugung und Streuung des Laserlichtes Aufschluß über Größe beziehungsweise Granularität der Zelle. Verwendet wurde ein FACS-Gerät (FACScan/FACSCalibur) der Firma Becton Dickinson, Heidelberg. Zur Fluoreszenzmarkierung dienten FITC-konjugierte Antikörper oder Propidiumjodid als Vitalitäts- oder DNA-Farbstoff.

3.6.1. Detektion von DNA mittels FACS

Der Farbstoff Propidiumjodid kann als Vitalitätsfarbstoff oder als DNA-färbende Substanz eingesetzt werden. Die Vitalitätsfärbung beruht darauf, daß nur tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und somit angefärbt werden können. Diese Färbemethode heißt Propidiumjodid-Ausschluß. Bei der Messung im FACS-Gerät ist es nicht möglich, nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden.

Bei der DNA-Färbung wurden die Zellen nach Waschen mit eiskaltem PBS und anschließendem Trypsinieren über Nacht in 70% Ethanol bei 4°C fixiert und vor der Messung mit 50 µg/ml Propidiumjodid für mindestens 15 min inkubiert, so daß der Farbstoff in die DNA interkalieren kann. Mittels der Propidiumjodid-Färbung kann das DNA-Profil der Zellen und somit deren Verteilung in den jeweiligen Zellzyklusphasen, sowie der Anteil apoptotischer DNA bestimmt werden.

3.6.2. Detektion von BrdU mittels FACS

1 x 10⁶ Zellen wurden in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Danach wurden die Zellen mit 10 µM BrdU (Sigma) im Medium für eine Stunde kultiviert, 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, trypsinisiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht in 70% Ethanol bei 4°C fixiert. Die Antikörperfärbung und der -nachweis im FACS Gerät erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers (Becton Dickinson, Heidelberg).

3.7. Immunhistologische Bestimmung der S-Phase-Zellen

Zur Bestimmung der S-Phase-Population wurden die Zellen in einer Dichte von 2.000 Zellen/cm² auf Objektträgern ausplattiert und 24 h anwachsen gelassen bzw. vor dem Versuch in der G₀-Phase synchronisiert. Danach wurden die Zellen 1-2 h mit Medium kultiviert, welches 60µM BrdU (Sigma) und 10% FCS enthielt, so daß die Zellen das BrdU einbauen konnten. Zur Fixierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1 Stunde in 4% PFA pH 7,2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, für 30 min bei 65°C in PBS inkubiert, 5 min bei RT mit PBS gewaschen, 10 min mit 0,3% H₂O₂/Methanol inkubiert und wiederum 5 min bei RT mit PBS gewaschen. Zum Öffnen der Zellen erfolgte eine Inkubation für 5 min in 0,1% Trypsin/PBS mit anschließendem Abstoppen des Verdaus durch 0,1µg/ml Trypsin-Inhibitor (Sigma) und 5 min Waschen mit PBS bei RT. Zur Freilegung des Epitops wurden die Zellen für 20 min in 2N HCl/PBS inkubiert und danach 5 min mit PBS gewaschen. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen für 30 min mit Pferdeserum geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (BrdU, 1:200; Calbiochem) inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 min mit PBS bei RT gewaschen und 30 min mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus) inkubiert. Die Färbereaktion mit dem ABC-Reagenz erfolgte nach den Angaben des Herstellers (ABC-Universal, Vector). Die so hergestellten Präparate konnten bei Bedarf mit Eosin gegengefärbt werden. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop analysiert.

4. Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Funktion von JunB in der Proliferation und bei der Regulation des Zellzyklus. Zur Untersuchung dieser zellautonomen Prozesse sind Fibroblasten analysiert worden, die kein funktionell aktives JunB-Protein mehr besitzen. Solche primären Fibroblasten sind von Andrea Kolbus und mir aus Tag 9.5 p.c. Wildtyp und JunB-defizienten Embryonen isoliert und zu Zelllinien (*Wildtyp*; *junB*^{-/-}) etabliert worden (Abb. 4).

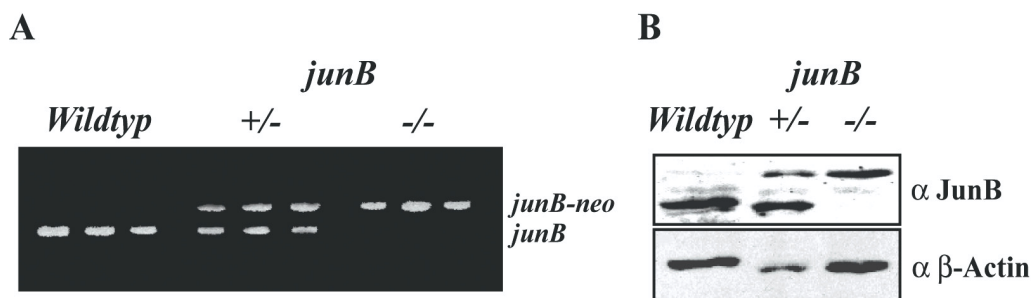


Abb. 4: Genotypisierung der verwendeten Zelllinien.

(A) Die Genotypisierung der immortalen Zelllinien erfolgte mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (Schorpp-Kistner et al., 1999). (B) Dieses Ergebnis wurde durch eine Proteinanalyse verifiziert, bei der ein JunB Antikörper verwendet wurde, der sowohl das Wildtyp als auch das JunB-Neo Fusionsprotein (höheres Molekulargewicht), das vom mutierten JunB Allel kodiert wird, erkennt.

4.1. *junB*^{-/-}-Fibroblasten zeigen eine normale Proliferation

Die Untersuchung der Proliferationsrate von JunB-defizienten Fibroblasten war naheliegend, da JunB hemmend auf c-Jun wirken kann und c-Jun-defiziente Fibroblasten einen Proliferationsdefekt aufweisen (Schreiber et al., 1999).

Aufgrund der gestörten Plazentaentwicklung sind die JunB-defizienten Embryonen am Tag 9.5 p.c. der Embryonalentwicklung sehr klein. Die geringe Anzahl von $7,6 \times 10^4$ Fibroblasten nach der Isolierung reicht aber dennoch aus, sie zu kultivieren und das Wachstumsverhalten der primären Zellen zu bestimmen. Dieses unterscheidet sich bei den *junB*^{-/-}-Fibroblasten nicht von dem der Wildtyp-Fibroblasten. JunB-defiziente und Wildtyp-Fibroblasten wachsen gleich an, teilen sich gleich und gehen mit zunehmender Kultivierungsdauer (alle drei Tage 1:3; Todaro und Green, 1963) gleichzeitig in eine Wachstums-Krise, in der sie ähnlich lange verbleiben. Die Zellen, die diese Krise überleben, wachsen anschließend unbegrenzt und sind als immortal zu bezeichnen (Abb. 5A).

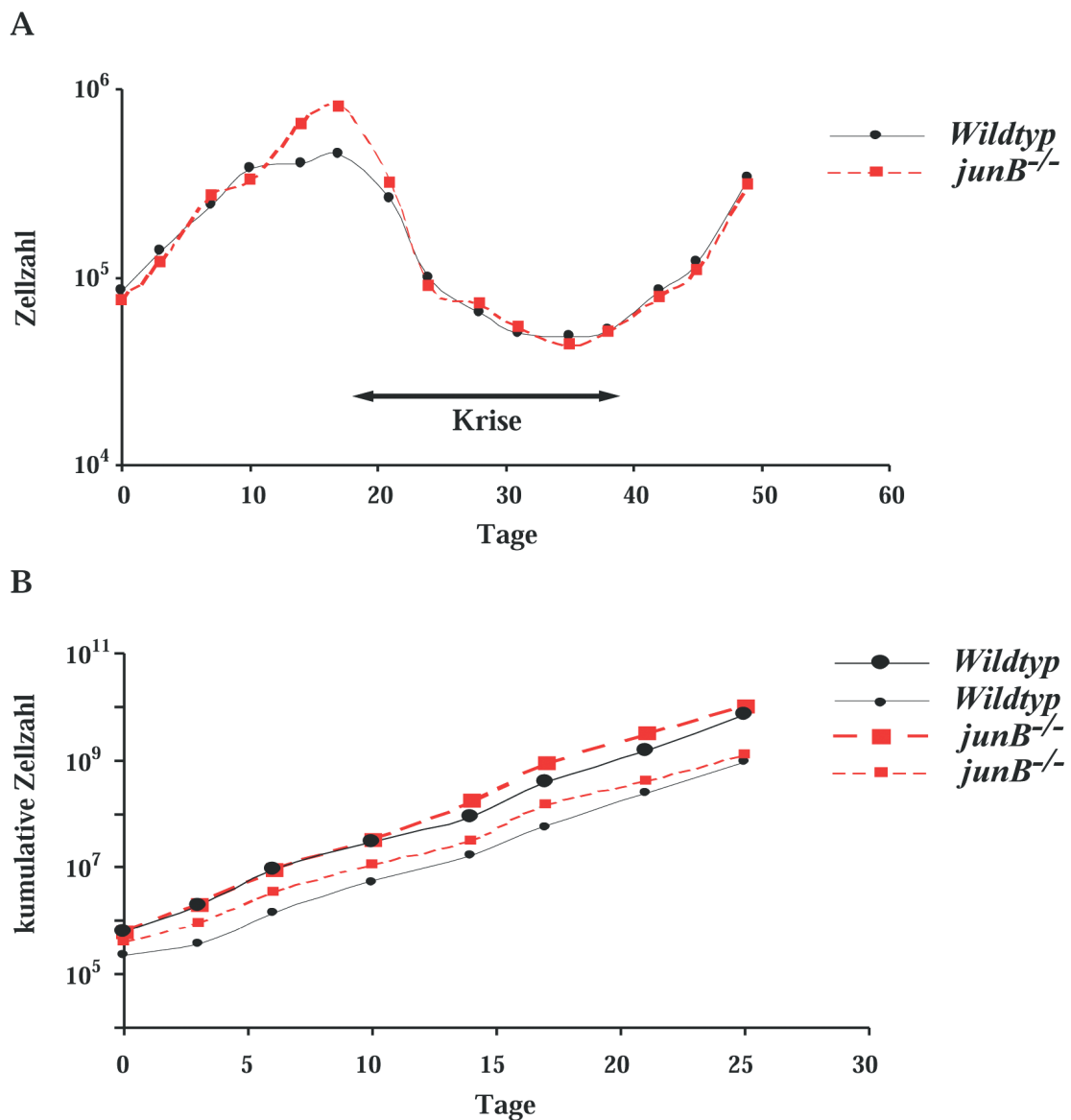


Abb. 5: JunB-defiziente Fibroblasten zeigen eine normale Proliferationsrate.

(A) Wachstumskurven von primären *Wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach der Isolierung aus E 9.5 p.c. Embryonen. (B) Das Proliferationsverhalten von zwei unabhängigen immortalen *junB*^{-/-}-Zelllinien (●) unterscheidet sich nicht von dem jeweiligen korrespondierenden *Wildtyp* (■). 2×10^5 Zellen wurden ausplattiert, regelmäßig passagiert und gezählt. Die kumulative Zellzahl wurde daraus berechnet und graphisch dargestellt

Die Proliferation der immortalen Fibroblasten wurde über die kumulative Zellzahl bestimmt, die sich aus der experimentell bestimmten Zellzahl und dem Verdünnungsfaktor errechnet (Abb. 5B). Ähnlich den primären Fibroblasten zeigen auch

die unsterblichen Zelllinien keinen signifikanten Unterschied in der Proliferation. Die Verdopplungszeit der JunB-defizienten Zellen beträgt 25 +/- 1 Stunde und die der Wildtyp-Fibroblasten 25 +/- 2 Stunden.

4.2. Verändertes Zellzyklusprofil in den JunB-defizienten Fibroblasten

Eine wesentlich genauere Methode zur detaillierten Untersuchung des Proliferationsverhaltens ist die Zellzyklus-Analyse mittels FACS („Fluorescence activated cell sorter“). Durch FACS-Analysen ist es möglich die Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu bestimmen. Dazu werden die Zellen in einem Puffer mit dem DNA-interkalierenden Agens Propidiumjodid, das nach Anregung mit einem Argon-Laser (488 nm) eine Fluoreszenz emittiert, aufgenommen und im FACS-Gerät (Durchflußzytometer) untersucht. Der DNA-Gehalt der Zelle ist dabei proportional zum interkalierten Propidiumjodid. Ein einfacher DNA-Gehalt ist charakteristisch für die G₁-Phase, ein doppelter für die G₂/M-Phase und ein zwischen diesen Phasen liegender für die S-Phase.

Eine Möglichkeit die Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu bestimmen, ist die Analyse von ständig proliferierenden, asynchron wachsenden Fibroblasten im FACS-Gerät. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, daß man nicht von einer vergleichbaren Ausgangspopulation ausgehen kann, da einzelne Zellen sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden und die Gesamtpopulation somit über den ganzen Zellzyklus verteilt ist. Im Gegensatz dazu liefert die Synchronisierung der Zellen in der G₀-Phase durch einen Wachstumsfaktorentzug für 48 Stunden und anschließende Restimulation mit Serum besser vergleichbare Ergebnisse, da bei dieser Methode mit der gleichen Ausgangspopulation (G₀) gestartet wird und die Zellen parallel durch den Zellzyklus laufen.

Obwohl die Proliferationsraten von primären und immortalen *junB*^{-/-}-Fibroblasten keinen Unterschied zum jeweiligen Wildtyp aufweisen, ergeben sich bei der FACS-Analyse im Vergleich zum Wildtyp sowohl bei den asynchron wachsenden als auch bei den synchronisierten *junB*^{-/-}-Zellen deutliche Veränderungen im Zellzyklusverlauf (Abb. 6). Die Anzahl der Zellen mit einem für die S-Phase typischen DNA-Gehalt ist signifikant vergrößert (Wildtyp: 6,2%; *junB*^{-/-}: 21,2%), während die G₁- und auch die G₂/M-Populationen verringert sind.

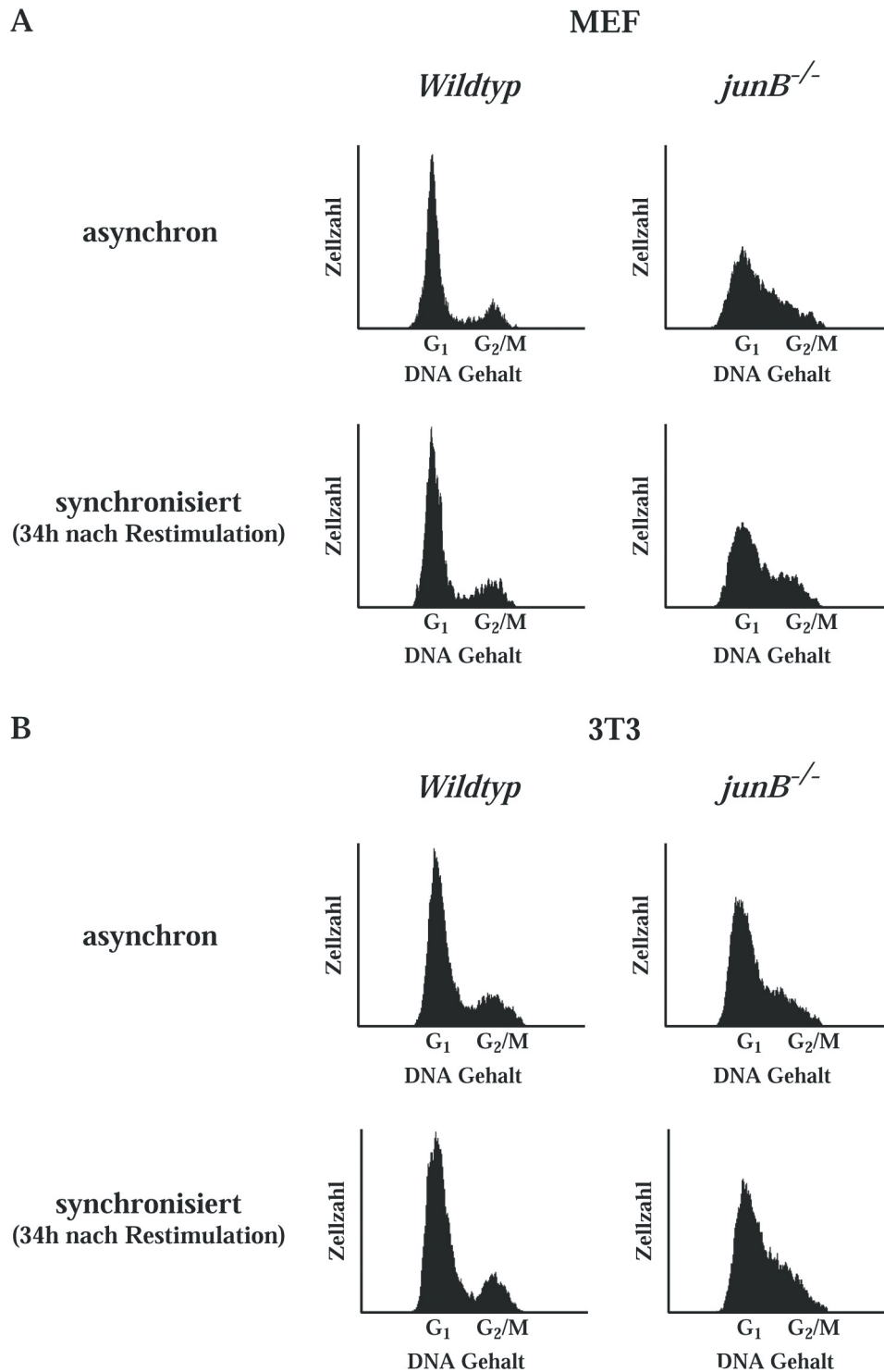


Abb. 6: Verändertes Zellzyklusprofil in den *junB^{-/-}*-Fibroblasten.

Analyse der Zellzyklusverteilung in asynchron wachsenden und synchronisierten primären (**A**; MEF) bzw. immortalen (**B**; 3T3) *Wildtyp*- und *junB^{-/-}*-Fibroblasten. Zur Synchronisierung in der G₀-Phase wurden die Zellen 48 Stunden in 0,5%-serumhaltigem Medium gehungert und anschließend mit 20%-serumhaltigem Medium zum synchronen Zellzyklusdurchlauf stimuliert. Nach 34 Stunden wurden die Zellen ebenso wie asynchron wachsende trypsiniert, Ethanol fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und zur Bestimmung des DNA-Gehalts im FACS-Gerät analysiert. Die Zellzahl ist gegen den DNA-Gehalt aufgetragen.

Da die Zellen in der S-Phase ihre DNA replizieren, wurde untersucht, ob die JunB-defizienten Fibroblasten aufgrund der vergrößerten S-Phase-Population eine vermehrte DNA-Synthese aufweisen. Dazu wurden asynchron wachsende Wildtyp- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten eine Stunde mit dem Basenanalogon Bromodeoxyuridin (BrdU) inkubiert. Das BrdU wird von den Zellen nur während der DNA-Replikation, d.h. während der S-Phase, in die neu-synthetisierte DNA eingebaut und kann anschließend mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers auf Einzelzellebene nachgewiesen werden.

Werden vergleichbare Zellzahlen von Wildtyp und JunB-defizienten Fibroblasten untersucht (Abb. 7, Kontrolle), so sind bei den *junB*^{-/-}-Zellen deutlich mehr BrdU-positive, gefärbte Zellen detektierbar (Abb. 7, α -BrdU). Dieses Ergebnis zeigt, daß die S-Phase-Population in den JunB-defizienten Fibroblasten signifikant vergrößert ist und bestätigt den Befund aus der FACS Analyse.

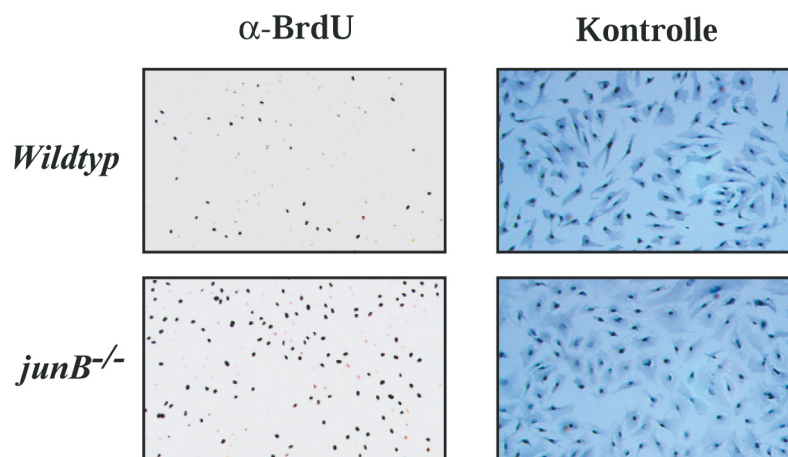


Abb. 7: In Abwesenheit von JunB sind mehr Zellen in der S-Phase.

Asynchron wachsende Zellen wurden für eine Stunde mit 60 μ M BrdU inkubiert, mit Paraformaldehyd fixiert und mit Hilfe eines BrdU-Antikörpers immunhistochemisch untersucht. Als Kontrolle sind parallel für eine vergleichbare untersuchte Zellzahl die angefärbten Fibroblasten in einer höheren Auflösung dargestellt.

Um die Effizienz des G₁/S-Übergangs in Wildtyp und JunB-defizienten Fibroblasten zu überprüfen, wurden die Zellen beim G₀-Phase-synchronisierten Zellzyklus-Durchlauf an charakteristischen Zeitpunkten jeweils für eine Stunde mit BrdU inkubiert. Diese Zeitpunkte wurden anhand von FACS-Analysen so gewählt, daß der

Übergang von der G_1 - in die S-Phase genau ermittelt werden konnte. Die Anzahl der Zellen, die sich zu den verschiedenen Zeitpunkten in der S-Phase befanden, wurde prozentual im Verhältnis zur Gesamtzellzahl errechnet (Abb. 8).

Die *junB*^{-/-}-Fibroblasten treten bereits 14 Stunden nach Serumstimulation in die S-Phase ein während der Wildtyp erst nach 16 Stunden in die S-Phase übergeht. Anhand dieser Ergebnisse scheinen die Zellen, bei denen JunB inaktiviert worden ist, einen Defekt im Übergang von der G_1 - in die S-Phase zu besitzen, der sich in einem früheren bzw. beschleunigten Eintritt der Zellen von G_1 nach S äußert.

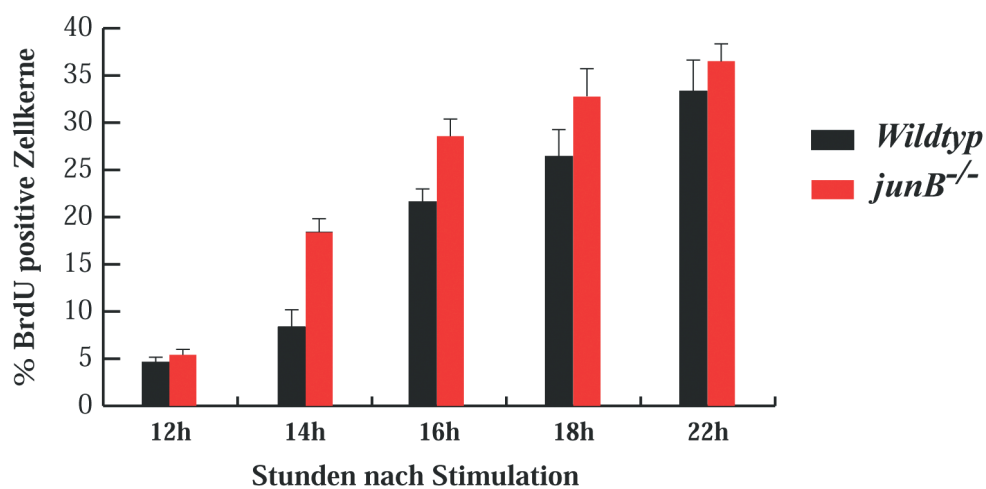


Abb. 8: JunB-defiziente Fibroblasten gehen früher in die S-Phase.

Wildtyp- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten wurden durch einen 48-stündigen Wachstumsfaktorentzug in der G_0 -Phase arretiert und anschließend mit 20%-serumhaltigem Medium restimuliert. Zu jedem dargestellten Zeitpunkt nach Stimulation wurden die Zellen eine Stunde mit 60 μ M BrdU inkubiert, mit Paraformaldehyd fixiert und einem BrdU-Antikörper immunhistochemisch analysiert. Der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten ist dargestellt.

4.3. Verstärkte Aktivität von Zyklin D-abhängigen Kinase-Komplexen in der G_1 -Phase

Zur detaillierten Untersuchung des beschleunigten Übergangs von der G_1 - in die S-Phase in den *junB*^{-/-}-Zellen wurde die Kinase-Aktivität bzw. Expression der wichtigsten Zellzyklusregulatoren für die G_1 -Phase in G_0 -Phase-synchronisierten und restimulierten Zellen im Zellzyklus-Ablauf bestimmt. Parallel dazu wurden FACS-Analysen durchgeführt, die belegen, daß sich die Zellen zu diesen Zeitpunkten in der späten G_1 - bzw. frühen S-Phase befanden (nicht gezeigt).

Die Aktivität der Zyklin D1- bzw. Zyklin E-assoziierten Kinase-Komplexe wurde durch Immunpräzipitation und anschließender *in vitro* Inkubation mit einem spezifischen Substrat und radioaktiv markiertem γ -ATP gemessen. Als Substrat wurde das aufgereinigte bakterielle Fusionsprotein GST-Rb für die Zyklin D1-assoziierten Kinasen (CDK4/CDK6) und Histon H1 für Zyklin E-assoziierte Kinasen (CDK2) verwendet. Die Produkte dieses *in vitro* Kinase-Nachweises wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die radioaktive Markierung der jeweiligen Substrate stellt dabei ein direktes Maß für die Aktivität der Kinasen dar (Abb. 9).

In Wildtyp-Zellen kann 16 Stunden nach Serumstimulation eine signifikante Zunahme der Zyklin D1-assoziierten Kinase-Aktivität festgestellt werden, die nach 20 Stunden ihr Maximum erreicht. Im Gegensatz dazu ist in den JunB-defizienten Zellen die Aktivität der Zyklin D1-assoziierten Kinasen bereits 12 Stunden nach Serumstimulation deutlich erhöht und das Maximum der Kinase-Aktivität verteilt sich auf einen zeitlichen Bereich von 16 bis 20 Stunden nach Stimulation der Zellen.

Die Analyse der Aktivität der Zyklin E-assoziierten Kinase-Komplexe ergibt ebenfalls signifikante Unterschiede. Zu frühen Zeitpunkten nach der Serumstimulation ist diese Aktivität in den JunB-defizienten Fibroblasten etwas erhöht im Vergleich zum Wildtyp, während die Hauptaktivität des Komplexes in beiden Genotypen erst 16 Stunden nach Serumstimulation deutlich sichtbar wird. Im Gegensatz zum Wildtyp gibt es in den JunB-defizienten Fibroblasten kein deutliches Maximum bei 20 Stunden, die höchste Aktivität des Kinase-Komplexes ist vielmehr auf den zeitlichen Bereich von 20 bis 24 Stunden verteilt.

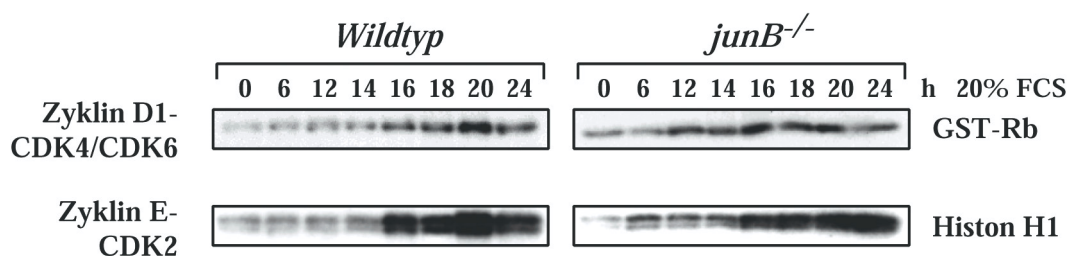


Abb. 9: Deregulierte Zyklin D1-CDK4/CDK6 Aktivität in Abwesenheit von JunB. Induktion der Zyklin D1-CDK4/CDK6 und Zyklin E-CDK2 Kinase-Aktivität in G_0 -synchronisierten und restimulierten Wildtyp- bzw. *junB*^{-/-}-Fibroblasten. Anti-Zyklin D1- bzw. Anti-Zyklin E-Immunpräzipitate wurden zu den angegebenen Zeitpunkten aus Gesamtzellextrakten isoliert und auf ihre GST-Rb- bzw. Histon H1- Phosphorylierungsaktivität überprüft.

Um zu überprüfen, ob die gezeigten Kinase-Aktivitäten auf einer veränderten Expression der einzelnen Zykline oder Kinasen beruhen, wurden die Proteinmengen der wichtigsten G₁-Phase Regulatoren auch im Western-Blot bestimmt (Abb.10). Die Expression von Zyklin D1 ist in Abwesenheit von JunB bereits 6 Stunden nach Serumstimulation deutlich erhöht während die Expression im Wildtyp erst nach 16 Stunden induziert wird. Eine Analyse der Expressionsmengen von Zyklin E ergibt nur eine leichte Erhöhung in den *junB*^{-/-}-Zellen.

Die Proteinmengen aller untersuchten Kinasen (CDK2, CDK4 und CDK6) war in beiden Genotypen (Wildtyp und *junB*^{-/-}) gleich und unterlagen wie erwartet keinen Schwankungen während des Zellzyklus.

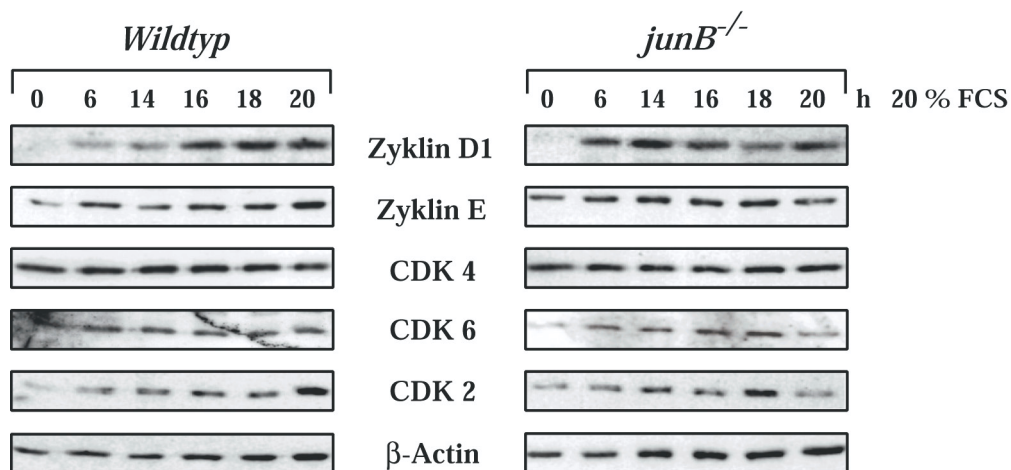


Abb. 10: Verfrühte Expression von Zyklin D1 in den *junB*^{-/-}-Zellen.

Die Menge der angezeigten G₁-Phase-Proteine in *Wildtyp*- bzw. *junB*^{-/-}-Fibroblasten wurde mittels Western-Blot zu den angegebenen Zeitpunkten nach G₀-Synchronisation und Restimulation (mit 20% FCS) untersucht. Als Vergleich für Qualität und Quantität der Proteinextrakte diente ein Western-Blot für β-Actin.

4.4. Die Transkript- und Proteinmenge des Zellzyklus-Inhibitors p16^{Ink4a} ist in Abwesenheit von JunB reduziert

Neben den bereits untersuchten Zyklinen und ihren spezifischen Kinasen ist die Regulation des G₁/S-Übergangs zusätzlich von den sogenannten CDK Inhibitoren (CKI) abhängig. Die für den G₁/S-Übergang entscheidenden CKIs sind p16^{Ink4a}, das spezifisch CDK4 und CDK6 inhibiert (Serrano, 1997), und p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip1}, die die Aktivität von Zyklin D-, Zyklin E- und Zyklin A-abhängigen Kinase-Komplexen beeinflussen (Gu et al., 1993; Harper et al., 1993). Die Mitglieder der Cip/Kip

Familie sind dabei sowohl negative als auch positive Regulatoren. Sie hemmen Zyklin E- und Zyklin A-Kinase-Komplexe, während sie Zyklin D-Kinase-Komplexe aktivieren können (Sherr und Roberts 1999).

Die Expression dieser drei CKIs wurde ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus-Ablauf untersucht (Abb. 11A). Während die Menge an p27^{Kip1} nicht unterschiedlich ist, sind die Proteinmengen von p21^{Cip1} in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten deutlich bzw. von p16^{Ink4a} drastisch reduziert (Abb. 11B). Der dramatische Unterschied in der Expression von p16^{Ink4a} läßt sich auch auf RNA-Ebene in einer RT-PCR Analyse mit p16^{Ink4a}-spezifischen Oligonukleotiden bestätigen. Für zwei unabhängige Fibroblasten-Zelllinien konnte demonstriert werden, daß die Transkription von p16^{Ink4a} signifikant reduziert ist.

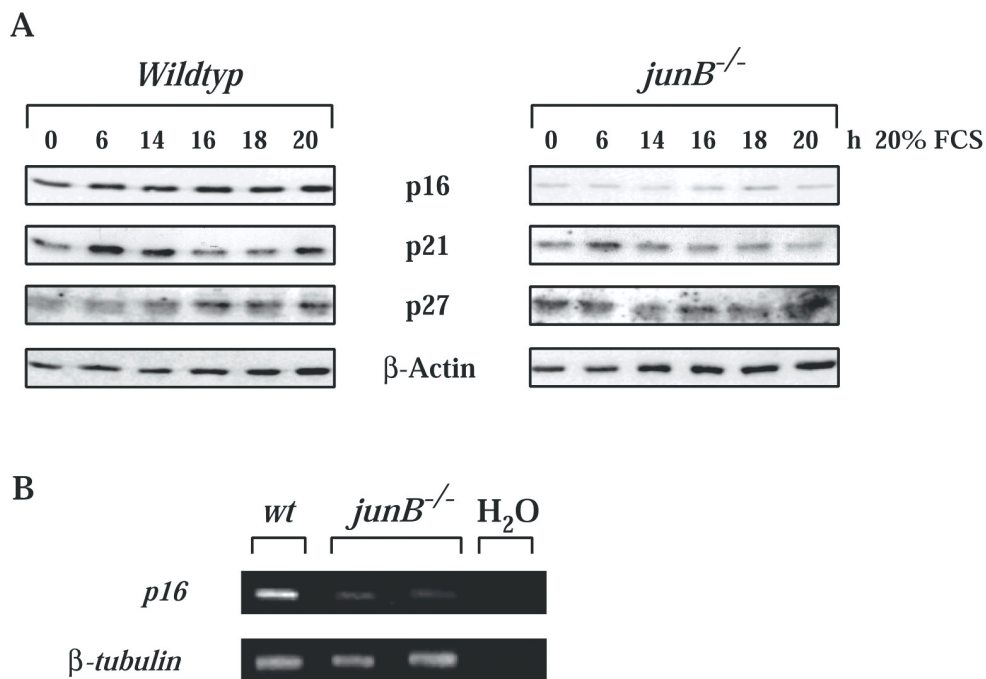


Abb. 11: Reduzierte Mengen an p16^{Ink4a} und p21^{Cip1} in Abwesenheit von JunB.

(A) In Zellextrakten von G₀-synchronisierten und restimulierten (mit 20% FCS) murinen Fibroblasten wurde die Expression der zyklinabhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI) p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} mittels Western-Blot im Vergleich zur β -Actin Kontrolle bestimmt. (B) Analyse der p16^{Ink4a} RNA-Menge in asynchron wachsenden Wildtyp- und zwei unabhängigen *junB*^{-/-}-Zelllinien durch RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für p16^{Ink4a} und β -Tubulin als internen Standard (H₂O: Leerkontrolle).

4.5. Reduzierte Expression von p53 und veränderte Aktivierungskinetik von c-Jun in den JunB-defizienten Fibroblasten

Die Transkription des *p21^{Cip1}* Gens wird von dem Protein des Tumorsuppressorgens *p53* reguliert (Levine, 1997). Die Analyse von G_0 -Phase-synchronisierten und restimulierten Zellen ergab eine Reduktion der *p53*-Expression in den JunB-defizienten Zellen, die letztlich wahrscheinlich die beobachtete Reduktion der *p21^{Cip1}* Expression zur Folge hat (Abb. 12A).

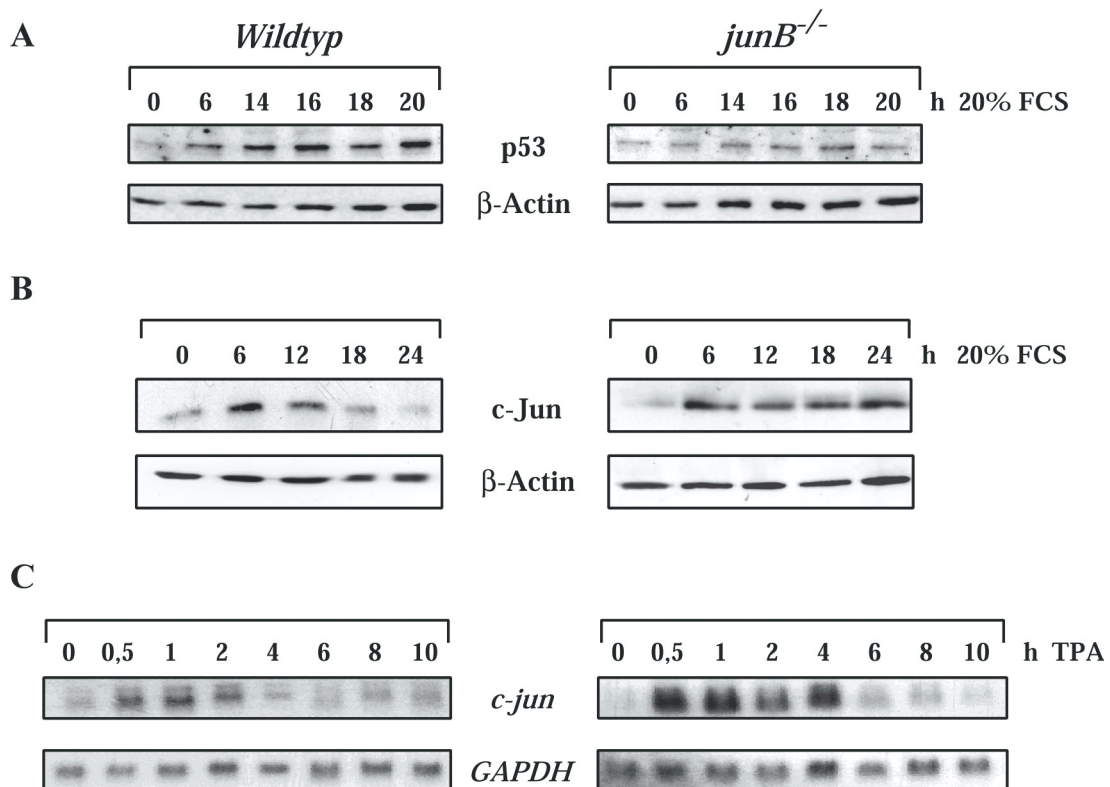


Abb. 12: Reduzierte Expression von p53 und veränderte Aktivierungskinetik von c-Jun in den JunB-defizienten Fibroblasten. (A) p53-Expression in G_0 -synchronisierten und restimulierten (20%) Fibroblasten im Vergleich zur β -Actin Kontrolle. (B-C) Induktion von c-Jun durch Serumstimulation in synchronisierten Zellen (B) bzw. von *c-jun*-Transkripten durch 100 ng/ml TPA in serumgehungerten Zellen (C) bestimmt durch Western- oder Northern-Blot Analyse. β -Actin bzw. *GAPDH* dienten als interne Kontrolle für Qualität und Quantität der Proteinextrakte bzw. der verwendeten Gesamt-RNA.

Da die Regulation von p53 unter anderem durch das AP-1 Protein c-Jun gesteuert wird (Schreiber et al., 1999) und JunB die c-Jun-abhängige AP-1 Aktivität inhibiert (Chiu et al., 1989; Deng et al., 1993), wurde die Expression von c-Jun im Zellzyklusverlauf von ebenfalls G_0 -Phase-synchronisierten und restimulierten Zellen untersucht (Abb. 12B). Die Expression von c-Jun ist in Abwesenheit von JunB

erhöht und im Vergleich zu der transienten Expression im Wildtyp zeitlich verlängert. Ein vergleichbares Ergebnis erhält man auch in einer Northern-Blot Analyse nach der Stimulation von serumgehungerten Fibroblasten mit einem starken Induktor (Karin und Smeal, 1992), dem Phorbol ester TPA (Abb.12C). Die transkriptionelle Aktivierung von c-Jun ist in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten signifikant erhöht und zeitlich um 12 Stunden verlängert, so daß sie nicht mehr der Kinetik eines „immediate early“-Gens entspricht.

Zusammengefaßt führt der Verlust von JunB zu einer verlängerten Expression von c-Jun, zu einer Reduktion von p16^{Ink4a}, p53 und p21^{Cip1} und dadurch zu einer verstärkten Aktivität von Zyklin D1-Kinase-Komplexen. Als direkte Konsequenz gehen die JunB-defizienten Fibroblasten schneller von der G₁- in die S-Phase.

4.6. Verlangsamtes Durchlaufen der S/G₂/M-Phasen in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten

Die *junB*^{-/-}-Zellen weisen trotz ihrer erhöhten Zyklin D1-CDK4/CDK6-Aktivität und des beschleunigten G₁/S-Übergangs keine gesteigerte Proliferationsrate auf wie dies für Zyklin D1 überexprimierende Zellen beobachtet wurde (Quelle et al., 1993). Dieses Paradoxon könnte nur dadurch erklärt werden, daß der Verlust von JunB zu einem späteren Zeitpunkt kritisch für den Ablauf des Zellzyklus ist und daß der beschleunigte G₁/S-Übergang durch eine Verlangsamung des Zellzyklus kompensiert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die späten Phasen des Zellzyklus zunächst mit Hilfe der FACS-Methode im Detail untersucht.

Bei dem ersten experimentellen Ansatz wurden asynchron wachsende Zellen zur Markierung der S-Phase Population eine Stunde mit BrdU inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in einem FACS-Gerät mit der Hilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten, spezifischen Antikörpers gegen BrdU und einer Propidiumjodid-Färbung analysiert. Die S-Phase- bzw. BrdU-positiven-Zellen lassen sich dabei anhand ihres DNA-Gehalts beim Durchlaufen des Zellzyklus verfolgen (Abb. 13). In den JunB-defizienten Fibroblasten sind sechs Stunden nach der BrdU-Inkubation immer noch deutlich mehr Zellen in der S-Phase (68%) und weniger in der G₂/M-Phase (21%) als im vergleichbaren Wildtyp (S-Phase: 52%; G₂/M-Phase: 33%). Da bei diesem Ansatz asynchron wachsende Zellen verwendet wurden, können die späten Phasen des Zellzyklus nicht unabhängig von den frühen betrachtet werden. So führt der be-

schleunigte Eintritt der *junB*^{-/-}-Fibroblasten in die S-Phase zu einer unterschiedlichen Ausgangssituation im Vergleich zum Wildtyp. Das Ergebnis deutet aber darauf hin, daß bei Abwesenheit von JunB in den Fibroblasten ein Defekt im späten Zellzyklus-Ablauf vorhanden ist.

	<i>Wildtyp</i>		<i>junB</i> ^{-/-}		nach BrdU Inkubation
	4h	6h	4h	6h	
S-Phase	71	52	77	68	% markierte Zellen
G ₂ /M-Phase	14	33	12	21	

Abb. 13: Analyse des Zellzyklusdurchlaufs mittels BrdU-Markierung.

Zur Analyse des Zellzyklusdurchlaufs wurden die Fibroblasten für eine Stunde mit 10 µM BrdU inkubiert, zu den angezeigten Zeitpunkten nach der Inkubation trypsiniert und Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend im FACS-Gerät mit Hilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten BrdU-Antikörpers und Propidiumjodid analysiert. Der Anteil der BrdU-positiven Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten in der S- bzw. den G₂/M Phasen ist dargestellt.

Eine besser geeignete Methode zur Analyse des Zellzyklus-Ablauf in den späten Phasen ist die Synchronisierung der Zellen in der S-Phase durch einen doppelten Thymidin-Block mit anschließender Restimulation, so daß für alle Zellen die gleiche Ausgangssituation gilt. Der doppelte Thymidin-Block basiert auf einem Überschuß von zugegebenem Thymidin, das über eine Rückkopplungshemmung der Nukleotidsynthese wirkt (Thomas und Lingwood, 1975; Abb. 14).

	<i>Wildtyp</i>			<i>junB</i> ^{-/-}			nach S-Phase Block
	0h	4h	6h	0h	4h	6h	
S-Phase	95	86	77	94	91	85	% Zellen
G ₂ /M-Phase	2	11	20	3	6	12	

Abb. 14: Analyse des Zellzyklusdurchlaufs in S-Phase synchronisierten Fibroblasten. Die Synchronisierung der Fibroblasten wurde durch einen doppelten Thymidin-Block mit 2 mM Thymidin erreicht. Nach der Restimulation mit 10%-serumhaltigem Medium wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten trypsiniert, Ethanol fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und anschließend im FACS-Gerät auf ihren DNA-Gehalt untersucht. Der prozentuale Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt charakteristisch für die S- bzw. die G₂/M-Phasen ist dargestellt.

Das Ergebnis dieses Versuchs macht deutlich, daß der Übergang von der S- in die G₂/M Phasen in Abwesenheit von JunB verzögert ist. Vier Stunden nach der Restimulation verbleiben signifikant mehr *junB*^{-/-}-Zellen in der S-Phase (91%) als beim vergleichbaren Wildtyp (86%). Dieser Unterschied ist sechs Stunden nach der Restimulation noch signifikanter, da im Vergleich zu 77% Wildtyp-Fibroblasten immer noch 85% der *junB*^{-/-}-Fibroblasten in der S-Phase verblieben sind.

4.7. Reduzierte Aktivität von Zyklin A- und Zyklin B-abhängigen Kinase-Komplexen in den S/G₂/M-Phasen

Die Durchwanderung des Zellzyklus von der S- in die G₂-Phase und weiter in die Mitose wird hauptsächlich durch die Aktivität der Zyklin A-CDK2 und Zyklin B-CDC2 Kinase-Komplexe reguliert (Desdouets et al., 1995b; Furuno et al., 1999). Dabei ist Zyklin A-CDK2 ein entscheidender Faktor für die DNA-Synthese und den Eintritt der Zellen in die Mitose während Zyklin B-CDC2 für den Ablauf der Mitose, besonders die Auflösung der Kernmembran und den Aufbau der Mitosespindel, wichtig ist (Furuno et al., 1999).

Die Aktivität der Zyklin A- bzw. Zyklin B-assoziierten Kinase-Komplexe wurde in G₀-Phase-synchronisierten und restimulierten Zellen zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus-Ablauf bestimmt. Die *in vitro* Phosphorylierung des Substrates Histon H1 in Gegenwart von radioaktiv markiertem γ -ATP nach einer Immunpräzipitation stellt dabei ein direktes Maß für die Aktivität der Komplexe dar und kann mit Hilfe der SDS-PAGE bestimmt werden (Abb. 15).

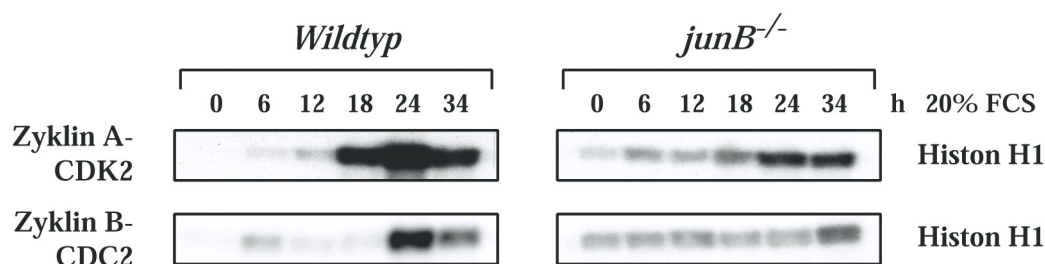


Abb. 15: Reduzierte Zyklin A-CDK2- und Zyklin B-CDC2-Aktivität in Abwesenheit von JunB.

Induktion der Zyklin A-CDK2 und Zyklin B-CDC2 Kinase-Aktivität in G₀-synchronisierten und restimulierten *Wildtyp*- bzw. *junB*^{-/-}-Fibroblasten. Anti-Zyklin A- bzw. Anti-Zyklin B-Immunpräzipitate wurden zu den angegebenen Zeitpunkten aus Gesamtzellextrakten isoliert und auf ihre Histon H1 Phosphorylierungsaktivität überprüft.

In Wildtyp-Zellen kann 18 Stunden nach Serumstimulation eine Zunahme der Aktivität der Zyklin A-assoziierten Kinasen festgestellt werden, die nach 24 Stunden maximal ist. Im Gegensatz dazu ist in den JunB-defizienten Zellen die Zyklin A-assoziierte Kinase-Aktivität sechs bzw. 12 Stunden nach Serumstimulation leicht erhöht, während eine deutliche Induktion erst nach 24 Stunden erreicht wird und die maximale Aktivität im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert ist.

Die Analyse von Zyklin B-assoziierten Kinase-Komplexen ergibt ebenfalls drastische Unterschiede. Die maximale Aktivität des Komplexes ist in Wildtyp-Zellen bereits 24 Stunden nach Serumstimulation nachweisbar, während die *junB*^{-/-}-Zellen nur eine geringe basale Aktivität mit einem kaum nachweisbaren Maximum bei 34 Stunden aufweisen.

Die Expression der einzelnen Zykline und Kinasen wurde mit Hilfe der Western-Blot-Methode untersucht (Abb. 16A). In Abwesenheit von JunB ist die Expression von Zyklin A im Vergleich zum Wildtyp zu späten Zeitpunkten verschoben und reduziert.

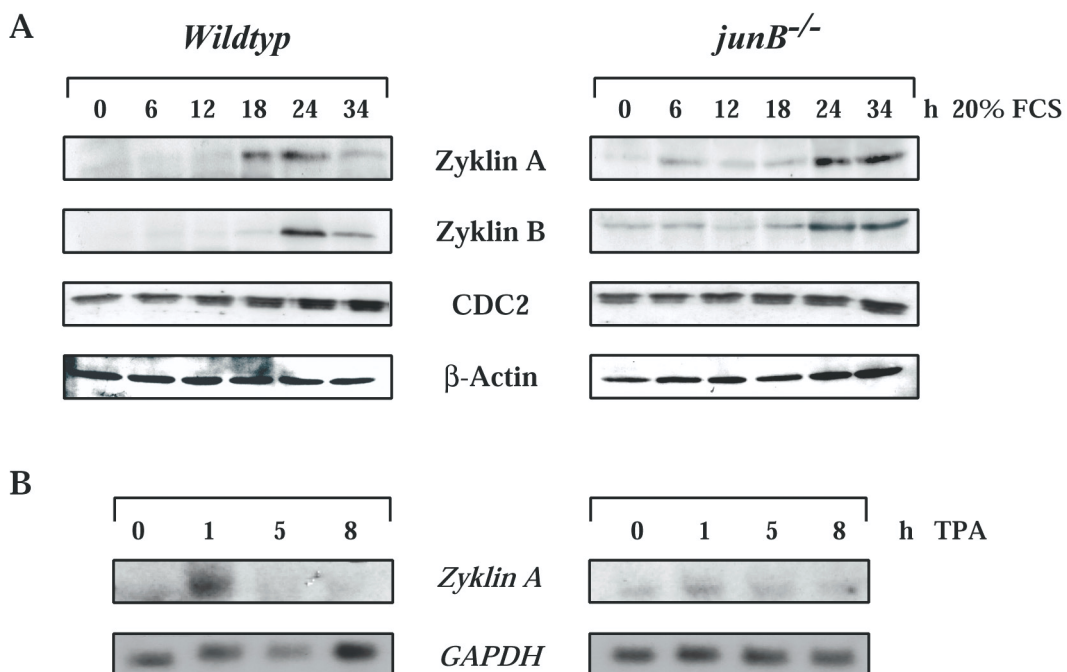


Abb. 16: Deregulierte Expression von Zyklin A in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten

(A) Die Menge der angezeigten Zellzyklus Proteine in den Fibroblasten wurde mittels Western-Blot zu den angegebenen Zeitpunkten nach G₀-Synchronisation und Restimulation (20% FCS) im Vergleich zur β-Actin Kontrolle untersucht. (B) Gesamt-RNA aus *Wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aus serumgehungerten Fibroblasten isoliert, die mit 100 ng/ml TPA stimuliert wurden. Die *Zyklin A*-Expression wurde mittels Northern-Blot bestimmt, *GAPDH* diente als interner Standard.

Die Expression von Zyklin B ist ebenfalls etwas reduziert, während die Mengen an CDK2 (Abb. 10) und CDC2 im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert sind. Parallele FACS-Analysen belegen, daß sich die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten in der S- bzw. G₂/M-Phase des Zellzyklus befanden (nicht gezeigt).

Die Northern-Blot Analyse von serumgehungerten und anschließend mit dem Phorbolster TPA stimulierten Zellen macht deutlich, daß JunB an der transkriptionellen Regulation von Zyklin A beteiligt ist (Abb. 16B). So ist die maximale transkriptionelle Aktivierung von Zyklin A in den JunB-defizienten Fibroblasten gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert.

4.8. JunB verstärkt die Transkription am *Zyklin A*-Promotor

Zur genauen Untersuchung der Regulation von Zyklin A wurden Promotorstudien durchgeführt. Dabei wurde die gut charakterisierte menschliche Zyklin A Promotorsequenz (Desdouets et al., 1995b) mit der bisher funktionell noch nicht genauer untersuchten murinen (NCBI Datenbank: U57826) verglichen. Diese Gegenüberstellung ergab konservierte Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren der CREB, E2F und SP-1 Protein-Familien (Abb. 17).

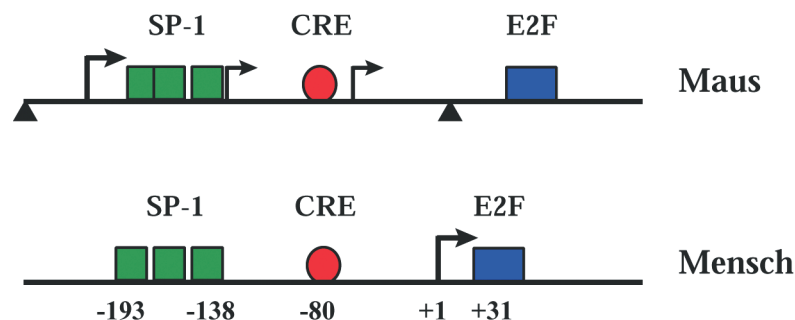


Abb. 17: Schematische Darstellung des murinen und des menschlichen Zyklin A-Promotors.

Konsensus Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren der CREB, E2F und SP-1 Protein-Familien und die Transkriptionsstartpunkte (groß: Haupt-; klein: Neben-) sind angegeben. Die schwarzen Pfeilspitzen geben den Bereich an, der mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und anschließend vor das Luziferase Reportergen kloniert wurde.

Es ist seit längerem bekannt, daß AP-1-Proteine mit niedrigerer Affinität im Vergleich zu der AP-1-Konsensussequenz (TRE) auch an eine Erkennungssequenz für CREB/ATF-Proteine (CRE) binden können (Ryseck und Bravo, 1991; Karin und Smeal, 1992). Aufgrund dessen war es naheliegend zu untersuchen, ob JunB an die Zyklin A CRE-Sequenz bindet und dadurch die Expression regulieren kann.

Dazu wurden zunächst *in vitro* Protein/DNA-Bindungsstudien (EMSA) mit der CRE-Sequenz aus dem murinen Zyklin A-Promotor durchgeführt. Nach Verwendung von Kernextrakten aus Wildtyp-Fibroblasten bildet sich ein Protein-Komplex an der Zyklin A CRE-Sequenz aus, der sich wahrscheinlich hauptsächlich aus den CREB-Proteinen zusammensetzt (Abb. 18A; *Wildtyp*, CRE). Interessanterweise konkurriert ein unmarkiertes Oligonukleotid, das eine AP-1-Konsensussequenz (TRE) enthält, zumindest teilweise um diese Bindung, was darauf schließen läßt, daß auch AP-1 in diesem Protein-Komplex vorhanden ist. Die dabei eingesetzte Menge an Kompetitor war ausreichend, um die Bindung von AP-1 an seine TRE-Konsensussequenz komplett aufzuheben (Abb. 18A; *Wildtyp*, TRE).

Führt man das gleiche Experiment mit Kernextrakten von JunB-defizienten Fibroblasten durch, so ist die Bindung von AP-1-Proteinen an die Zyklin A CRE-Sequenz nicht mehr nachweisbar. Es bindet deutlich weniger Protein als im Wildtyp an die Zyklin A CRE-Sequenz und diese gebundenen Proteine können nicht mit einem unmarkiertem TRE- Oligonukleotid verdrängt werden (Abb. 18A; *junB*^{-/-} CRE). Als Kontrolle für die Qualität und die eingesetzte Menge an Kernextrakt wurden parallel dazu EMSA Studien mit einem OCT-Oligonukleotid durchgeführt, an das der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Oct bindet (Abb. 18A; OCT; Annweiler et al., 1994).

Eine Beteiligung von c-Jun und JunB an dem Komplex, der an die Zyklin A CRE-Sequenz bindet, wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen c-Jun und JunB nachgewiesen. Die Zugabe von c-Jun- bzw. JunB-spezifischen Antikörpern vor der Inkubation des Oligonukleotids zu den Kernextrakten hat einen zusätzlichen Antikörper-Protein/Oligonukleotid-Komplex zur Folge, der sich durch ein verändertes Laufverhalten auszeichnet, und als sogenannter „supershift“ bezeichnet wird.

An der Konsensus TRE-Sequenz ergeben sich mit diesem Verfahren starke zusätzliche Komplexe („supershifts“) für JunB und c-Jun (Abb. 18B; TRE). Parallel dazu binden JunB und c-Jun ebenfalls an die Zyklin A CRE-Sequenz, allerdings sind die zusätzlichen Komplexe („supershifts“) aufgrund der geringeren Affinität von AP-1-Proteinen zur CRE-Sequenz schwächer (Abb. 18B; CRE).

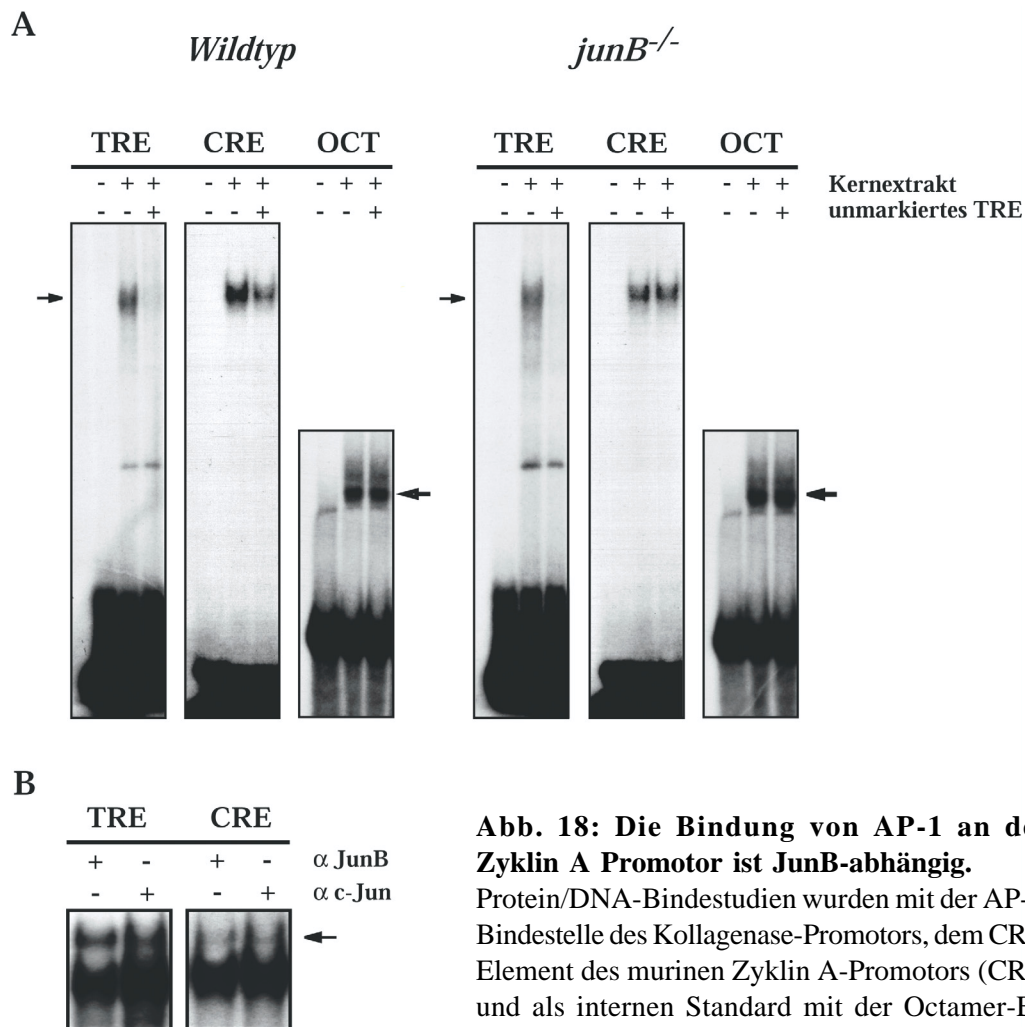


Abb. 18: Die Bindung von AP-1 an den Zyklin A Promotor ist JunB-abhängig.

Protein/DNA-Bindestudien wurden mit der AP-1-Bindestelle des Kollagenase-Promotors, dem CRE-Element des murinen Zyklin A-Promotors (CRE) und als internen Standard mit der Octamer-Erkennungssequenz (OCT, große Pfeile) durchgeführt. Kernextrakte aus exponentiell wachsenden

Wildtyp- und *junB^{-/-}*-Fibroblasten wurden mit den markierten Proben wie oben angezeigt inkubiert und anschließend mittels PAGE aufgetrennt. (A) Die Protein/DNA-Komplexbildung von Kernextrakten aus *Wildtyp*-Zellen am CRE kann durch Konkurrenz mit 0,4 pmol unmarkiertem TRE partiell aufgehoben werden. Die gleiche Menge an TRE reicht aus, um die AP-1-Bindung am TRE komplett zu verhindern. Kernextrakte aus *junB^{-/-}*-Zellen zeigen eine verminderte Komplexbildung am CRE, die nicht mehr mit dem unmarkierten TRE aufgehoben werden kann (CRE). AP-1 spezifische Komplexe sind durch kleine Pfeile gekennzeichnet. (B) c-Jun und JunB sind Bestandteile des AP-1-Komplexes am CRE-Element des Zyklin A-Promotors. Kernextrakte wurden mit Antikörpern gegen c-Jun und JunB vorinkubiert. Die resultierenden zusätzlichen Protein/DNA/Antikörper-Komplexe („supershifts“) sind durch einen Pfeil markiert.

Der funktionelle Beweis dafür, daß die Bindung von JunB und c-Jun einen Einfluß auf die transkriptionelle Regulation von Zyklin A besitzen, sollte durch Ko-expressionsanalysen von Zyklin A-Reporterkonstrukten mit *junB* und *c-jun* in murinen F9 Teratokarzinomzellen erbracht werden. Diese F9-Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie eine niedrige endogene AP-1 Aktivität besitzen (Angel et al., 1988a).

Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden wurde ein 900 kb großer Bereich des murinen *Zyklin A*-Promotors amplifiziert (Abb. 17) und vor das *Luziferase*-Gen gesetzt. Dieses *Zyklin A*-*Luziferase*-Reporter-gen wurde dann mit Expressionsvektoren für *c-jun* und *junB* unter der Kontrolle des Rous-Sarkoma-Virus Promotors (RSV) oder einem leeren Expressionsvektor (RSV-0) in F9 Zellen kotransfiziert, um anschließend die Zyklin A-abhängige Luziferase-Aktivität zu bestimmen. Die Luziferase-Aktivität wurde mit Hilfe eines nicht induzierbaren ebenfalls kotransfizierten LacZ-Vektors als Transfektionskontrolle (LacZ Test) normalisiert (Abb. 19).

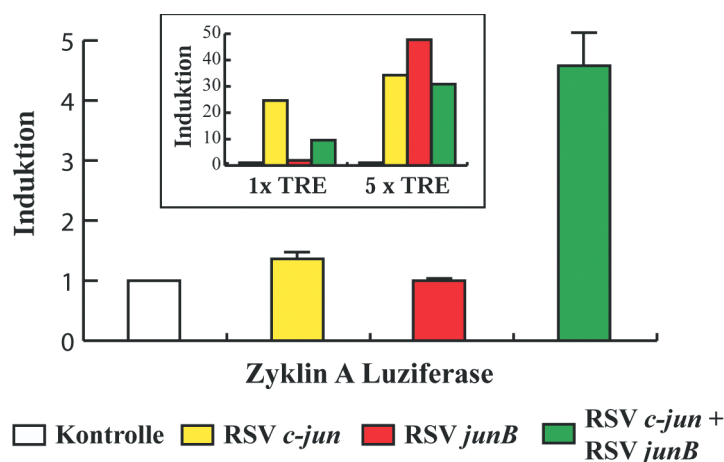


Abb. 19: JunB aktiviert den Zyklin A Promotor.

F9 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für *c-jun*, *junB* und einem Leervektor unter der Kontrolle des RSV-Promotors (2,5µg) und dem *Zyklin A*-*Luziferase*-Konstrukt (2,5µg) als sogenannter Reporter kotransfiziert. Das verkleinerte Schaubild zeigt die Ergebnisse von Kontrolltransfektionen, bei der die Aktivität der Expressionsvektoren auf Reportergene gemessen wurde, die eine bzw. fünf TRE-Sequenzen in ihrem Promotor enthielten. Die Induktion der Reportergene ist in Relation zur Transaktivierung durch den Leervektor angegeben.

Parallel dazu wurden Kontrolltransfektionen mit Reportergenen durchgeführt, die eine bzw. fünf TRE-Sequenzen in ihrem Promotor enthielten. Die Expression des Reportergens mit der singulären TRE-Sequenz wird durch c-Jun aktiviert, während sie durch JunB gehemmt wird. Im Gegensatz dazu wirkt JunB als starker Transaktivator auf das Reportergen mit multiplen TRE-Elementen. Auf die basale Expression des Zyklin A-Promotors haben JunB und c-Jun alleine keinen Einfluß. Allerdings führt die Koexpression beider Proteine erstaunlicherweise zu einer vierfachen Transaktivierung.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Expression von Zyklin A direkt von JunB moduliert werden kann. Ein Verlust von JunB führt zu einer reduzierten Aktivität von Zyklin A- und Zyklin B-Kinase Komplexen und zieht damit eine verlangsamte Progression von der S- in die G₂/M Phasen nach sich.

4.9. Die Überexpression von JunB führt zu einer verlangsamten Proliferation und einem Anstieg der p16^{Ink4a}-Expression

Zur Unterstützung der bisherigen Ergebnisse wurde der Einfluß der Überexpression von JunB in Wildtyp-Fibroblasten der Maus untersucht. Dazu wurden diese Fibroblasten mit einem Expressionsvektor für JunB, der unter der Kontrolle des Ubiquitin C-Promotors steht (Schorpp et al., 1996), transfiziert und mittels kotransfiziertem Selektionsmarker für Neomycin (14 Tage mit 0,8mg/ml G418) auf einen stabilen Einbau selektioniert (von Dr. Bettina Hartenstein zur Verfügung gestellt). Aus den individuellen Zellklonen wurde dann die genomische DNA isoliert und zur Genotypisierung mit Hilfe einer spezifischen PCR verwendet (Abb. 20A). Positive stabile JunB-Zelllinien wurden mit Hilfe einer Western-Blot Analyse mit einem Antikörper gegen JunB auf die Expression von JunB überprüft. Die Überexpression von JunB in den Wildtyp-Fibroblasten hat eine verlangsamte Proliferation im Vergleich zu nicht transfizierten Wildtyp-Zellen zur Folge (Abb. 20C). In den JunB-überexprimierenden Zellen ergeben dann auch FACS-Analysen eine vergrößerte G₁-Population (*ubi-junB* 63,7%; Wildtyp: 56,9 %) und Western-Blot Analysen eine deutlich erhöhte Expression von p16^{Ink4a} (Abb. 20B). Am S/G₂/M Übergang sind allerdings keine Veränderungen zu erkennen.

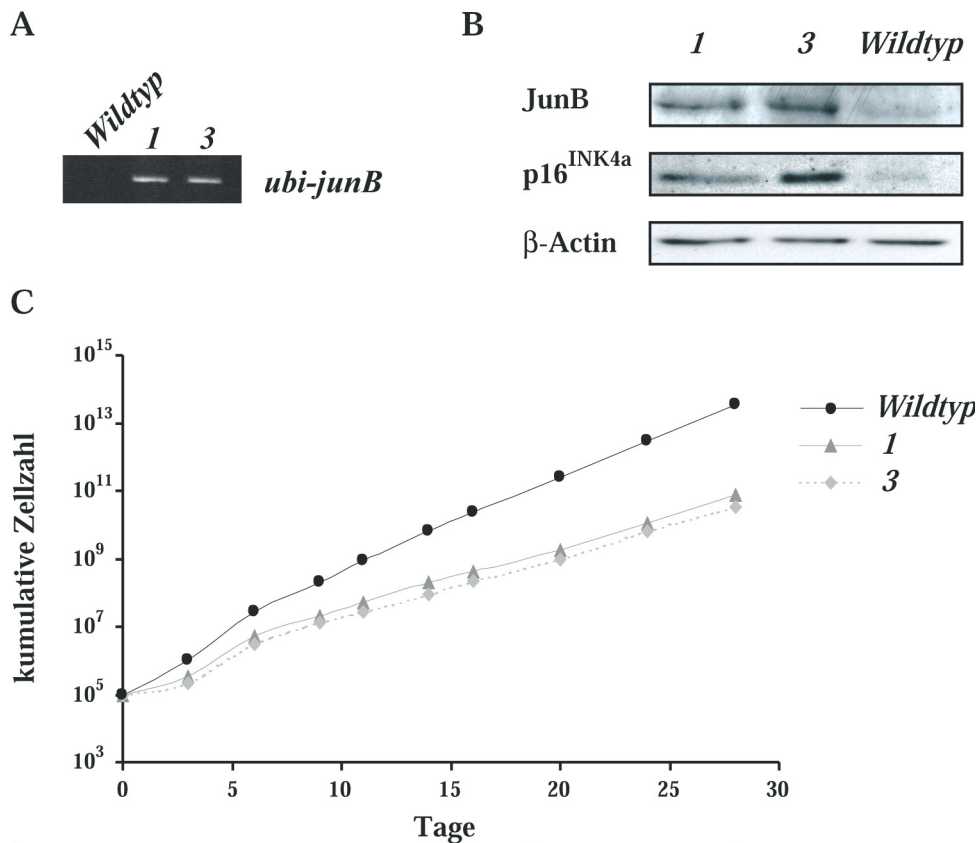


Abb. 20.: Die Überexpression von JunB führt zu einem Anstieg der p16^{INK4a} Expression und zu einer verlangsamten Proliferation.

(A) Genotypisierung der überexprimierenden Zelllinien mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden für *ubi-junB*. (B) Die Menge der angegebenen Proteine wurde durch die Western-Blot Analyse in Zellextrakten von asynchron wachsenden *Wildtyp*- und JunB-überexprimierenden Zellen (1, 3) im Vergleich zur β-Actin Kontrolle untersucht. (C) Die überexprimierenden Zelllinien (1: ▲, 3: ◆) proliferieren langsamer als der vergleichbare Wildtyp (●). Die Zellen wurden alle drei bzw. vier Tage passagiert und gezählt. Die kumulative Zellzahl wurde daraus berechnet und graphisch dargestellt.

4.10. Ein posttranslationell aktivierbares JunB-ER-Protein revertiert die Zellzyklus-Defekte in den JunB-defizienten Fibroblasten

Die beobachteten Veränderungen im Zellzyklus könnten aufgrund eines primären Defekts oder als Folge eines langanhaltenden Verlusts von JunB zustande kommen. Das Wiedereinbringen eines posttranslationell aktivierbaren JunB-ER-Proteins sollte primär verursachte Defekte wieder aufheben und zusätzlich könnte dadurch ausgeschlossen werden, daß sekundäre Mutationen, die während des Immortalisierungsprozesses aufgetreten sein könnten, ursächlich für die beschriebenen Zellzyklusdefekte sind.

Zur Herstellung eines solchen *junB-ER*-Expressionsvektors wurde die vollständige *junB*-cDNA mit der Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne (ER) aus dem *pMV7 c-jun-ER*-Vektor (Bossy-Wetzel et al., 1997) fusioniert und in einen Expressionsvektor unter der Kontrolle des Ubiquitin C-Promotors (Ubi; Schorpp et al., 1996) oder des Rous-Sarkoma-Virus-Promotors (RSV) eingesetzt. Die fusionierte Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne (ER) sorgt dafür, daß das exprimierte JunB-ER-Protein in einem inaktiven Zustand vorliegt, da das Fusionsprotein mit HSP90, HSP70 und anderen Chaperonen im Zytoplasma der Zelle komplexiert ist. Erst die Bindung des spezifischen Liganden an die Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne (ER) induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Auflösung des Fusionsprotein/Chaperon-Komplexes und damit zur Aktivierung führt (Abb. 21). Im vorliegenden Fall wurde eine Punktmutante der ER-Sequenz verwendet (ERTM), die zur Folge hat, daß nur die Zugabe des synthetischen Steroids 4-Hydroxy-Tamoxifen zur posttranslationalen Aktivierung des Fusionsproteins führt ohne daß das synthetische Steroid unerwünschte Nebeneffekte induziert (Mahfoudi et al., 1995).

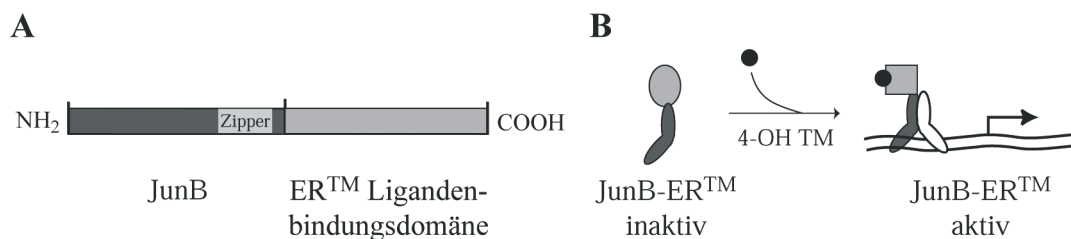


Abb. 21: Schematische Darstellung der Primärstruktur und des Funktionsprinzips des JunB-ERTM Fusionsproteins.

(A) Die vollständige JunB-cDNA wurde vor die mutierte Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ERTM) kloniert. (B) Nach Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen verändert das Fusionsprotein seine Konformation und geht in einen aktiven Zustand über.

Die induzierbare Aktivität des Fusionsproteins wurde mittels Koexpressions-Experimenten in F9 Zellen überprüft, in denen die Expression eines Chloramphenicol-Transferase (CAT) Reportergens unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors mit einer bzw. fünf AP-1-Erkennungssequenzen (TRE) steht. 4-Hydroxy-Tamoxifen alleine hat bei der verwendeten Konzentration keinen Einfluß auf die Aktivierung der TRE-CAT Reportergene (Daten nicht gezeigt). In Abwesenheit von Hormon entwickelt das inaktive JunB-ERTM-Protein unter der Kontrolle des RSV-Promotors

eine basale Transaktivierung auf das CAT-Reportergen mit multiplen TRE-Elementen, während dies bei Verwendung des *ubi-junB-ERTM*-Konstrukts deutlich geringer ist. Eine spezifische Aktivierung des JunB-ERTM-Proteins sowohl unter der Kontrolle des RSV-Promotors als auch unter der Kontrolle des Ubiquitin C-Promotors führt nach der Induzierung mit 100 nM 4-Hydroxy-Tamoxifen zu einer vergleichbaren Transaktivierung des 5 x TRE-CAT-Reportergens (Abb. 22). Die Transaktivierung ist dabei ähnlich wie nach Verwendung des konstitutiv aktiven *RSV-junB*-Vektors.

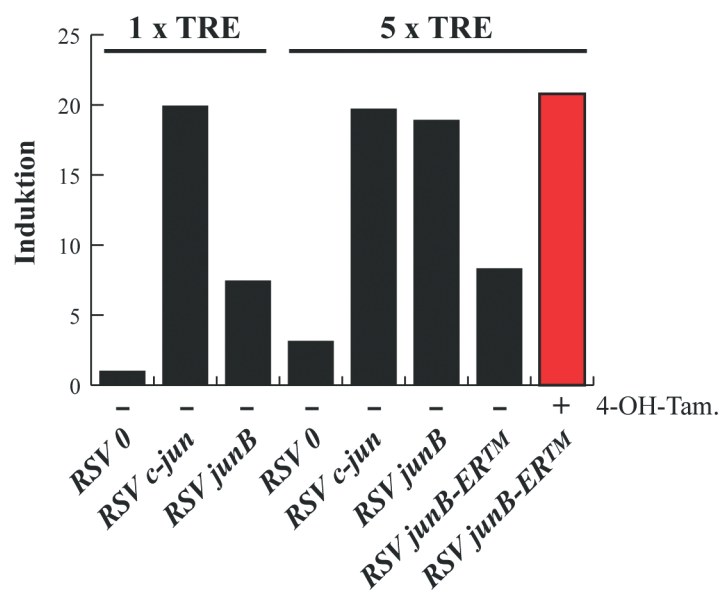


Abb. 22: Das JunB-ERTM-Fusionsprotein ist durch 4-Hydroxy-Tamoxifen induzierbar und aktiviert den Reporter mit multiplen TRE-Elementen.

F9 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für *c-jun*, *junB*, *junB-ERTM* und einem Leervektor unter der Kontrolle des RSV-Promotors transfiziert (3µg). Als Reporter wurde das CAT-Gen mit einer bzw. fünf TRE-Elementen im Promotor verwendet (3µg). Die Zellen wurden 16 Stunden mit (+) oder ohne (-) 4-Hydroxy-Tamoxifen kultiviert. Die Induktion durch das aktive JunB-ERTM ist in der Abbildung rot dargestellt.

Das JunB-ERTM Fusionsprotein unter der Kontrolle des Ubiquitin C-Promotors besitzt eine wesentlich geringe Hintergrundaktivität, ermöglicht nach Behandlung mit Hormon die volle Induzierbarkeit und verhält sich bei der Transaktivierungsanalyse wie *RSV-junB-ERTM* (nicht gezeigt). Daher wurde *ubi-junB-ERTM* für die weitere Analyse der JunB-abhängigen Veränderungen im Zellzyklus verwendet. JunB-defiziente Fibroblasten wurden mit dem *ubi-junB-ERTM*-Expressionsvektor transfiziert und mittels kotransfiziertem Selektionsmarker für Hygromycin B (14 Tage 50-100 µg/ml) auf einen stabilen Einbau selektioniert. Aus individuellen

Zellklonen wurde die genomische DNA isoliert und mit Hilfe einer spezifischen PCR genotypisiert (Abb. 23). Positive stabile *junB*^{-/-} / *junB-ER*TM-Zelllinien, die das *junB-ER*TM stabil integriert hatten, wurden auf die Expression des Fusionsproteins JunB-ERTM mit Hilfe einer Immunpräzipitation und anschließender Western-Blot Analyse überprüft. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Klone mit der geringsten Hintergrundaktivität und solche die keine Abbauprodukte zeigten ausgewählt.

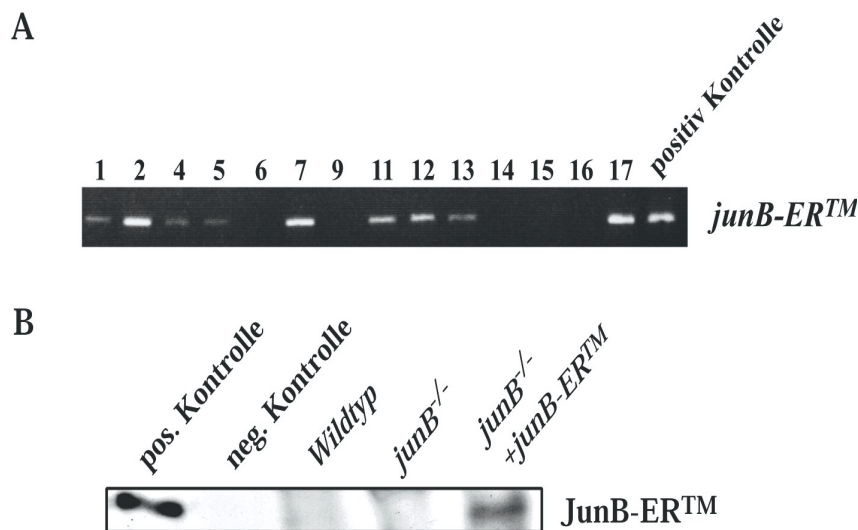


Abb. 23: Überprüfung der JunB-ERTM Zelllinien.

(A) Genotypisierung der *junB-ER*TM-Zelllinien durch eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für das fusionierte *junB-ER*TM. Als Positiv Kontrolle wurde parallel eine PCR mit der *junB-ER*TM Plasmid-DNA durchgeführt. (B) Nachweis des Fusionsproteins durch Immunpräzipitation mit einem Jun-Antikörper und anschließender Western-Blot Analyse mit einem JunB-Antikörper. Als Positivkontrolle diente ein Extrakt aus F9-Zellen nach transients Transfektion mit *ubi-junB-ER*TM.

Die Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen zu Wildtyp und nicht transfizierten JunB-defizienten Zellen hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklus (nicht gezeigt). Die Aktivierung des JunB-ERTM-Proteins durch 4-Hydroxy-Tamoxifen in den ausgewählten stabilen Zelllinien dagegen führt fast zu einer vollständigen Revertierung der oben beschriebenen Zellzyklus-Defekte (Abb. 24). Die S-Phase Population nimmt nach der Aktivierung durch 4-Hydroxy-Tamoxifen von 19,7% auf 10,1% ab, während der G₁-Anteil von 72,2% auf 75% und der G₂/M-Anteil von 8,1% auf 14,9% deutlich zunimmt. Die Wildtyp Verteilung wird jedoch nicht ganz erreicht (Abb. 24A).

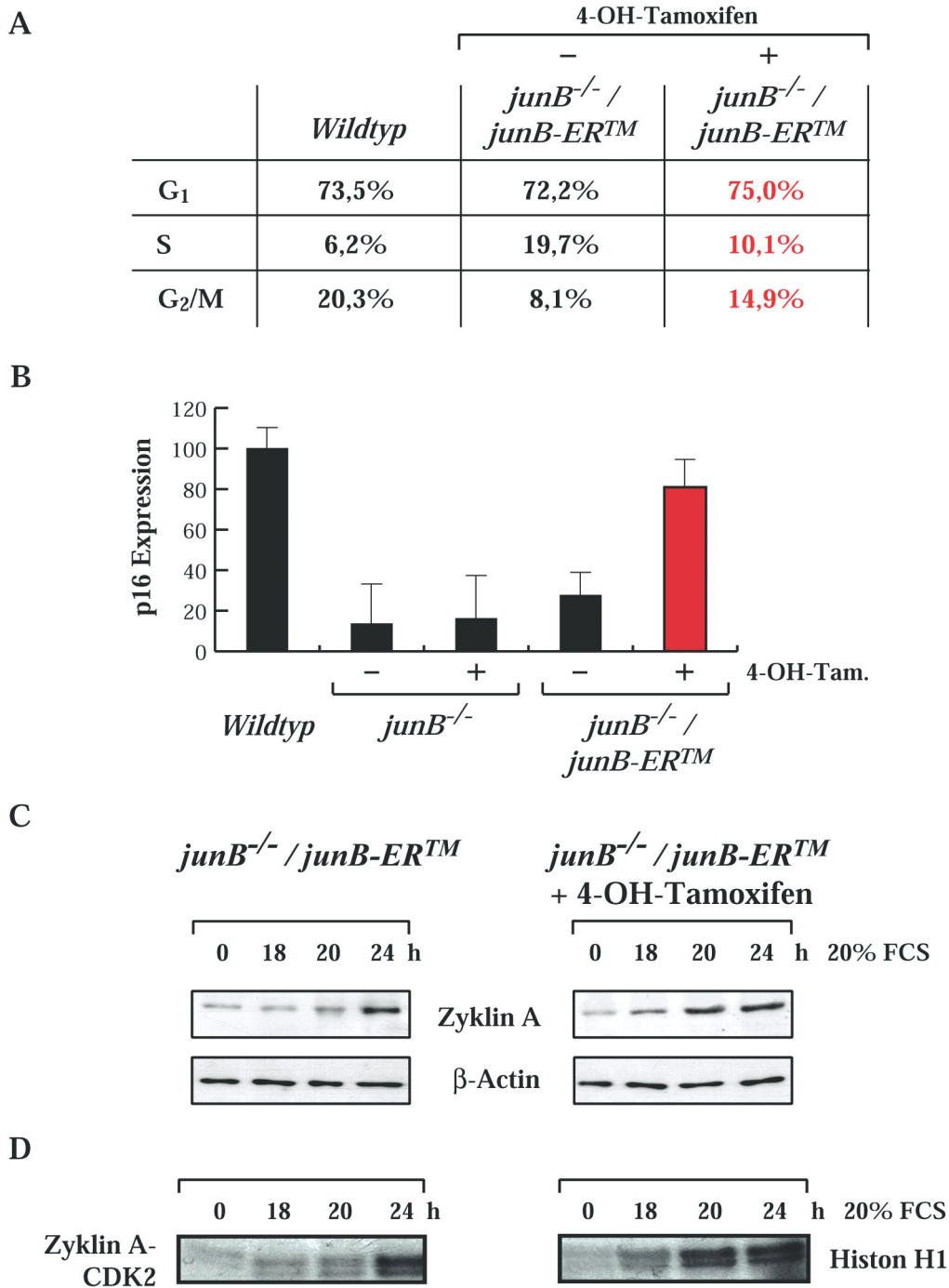


Abb. 24: Revertierung der Zellzyklusdefekte durch JunB-ERTM.

(A) Analyse der Zellzyklusverteilung in asynchron wachsenden *Wildtyp*- und *junB*^{-/-}/*junB-ER*TM-Fibroblasten nach Kultivierung mit (+) oder ohne (-) 4-OH-Tamoxifen. Die Zellen wurden trypsinisiert, Ethanol fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und zur Bestimmung des DNA-Gehalts im FACS-Gerät analysiert. (B) Die Proteinmenge an p16^{INK4a} in asynchron wachsenden Fibroblasten ohne oder in Gegenwart von 4-OH-Tamoxifen wurde mittels Western-Blot im Vergleich zu einer β-Actin Kontrolle untersucht. (C-D) Induktionskinetik von Zyklin A und Bestimmung der Zyklin A-CDK2-Aktivität in G₀-synchronisierten und restimulierten (20% FCS) *junB*^{-/-}/*junB-ER*TM-Fibroblasten in An- bzw. Abwesenheit von 4-OH-Tamoxifen.

Weiterhin wird die Expression von p16^{Ink4a} nach der Aktivierung des JunB-ERTM-Proteins größtenteils wiederhergestellt (Abb. 24B). Die Kinetik sowie der Aktivierungsgrad von Zyklin A bzw. der Zyklin A-assoziierten Kinase-Komplexe wird ebenfalls nach der Aktivierung des JunB-ERTM-Proteins wieder rekonstituiert (Abb. 24 C, D), so daß der verzögerte S/G₂/M-Übergang normalisiert werden kann. Die beschriebenen Zellzyklusdefekte sind also ausschließlich JunB-abhängig, da sie durch die Wiedereinbringung von JunB aufgehoben werden können.

5. Diskussion

Zahlreiche Studien haben sich in den letzten Jahren bemüht zu klären, wie Mitogene wachstumsfördernd wirken, welche Signaltransduktionskaskaden involviert sind und auf welchen molekularen Mechanismen das Ganze basiert. Allerdings ist immer noch nicht genau geklärt, wie diese Mitogen-aktivierten Signaltransduktionskaskaden den Ablauf des Zellzyklus regeln (Downward, 1997). Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein entscheidender Endpunkt solcher Signalketten und stellt eine wichtige Verbindung zwischen der mitogenen Signalübertragung und der Zellzyklusregulation dar, wie kürzlich für die AP-1-Untereinheit c-Jun nachgewiesen werden konnte (Schreiber et al., 1999; Wisdom et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit ist die Rolle von JunB in der Proliferation und der Regulation des Zellzyklus unter Verwendung von *junB*^{-/-}-Fibroblasten untersucht worden. Bisher sind, basierend auf *in vitro* Transfektionsstudien, kontroverse Rollen für JunB beschrieben worden. Zum einen wurde eine hemmende Wirkung von JunB auf die c-Jun-abhängige Transaktivierung von Promotoren mit einer singulären AP-1-Erkennungssequenz gezeigt (Chiu et al., 1989; Deng et al., 1993), zum anderen kann JunB-Promotoren mit multiplen AP-1-Erkennungssequenzen aktivieren (Chiu et al., 1989).

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit machen deutlich, daß JunB einen positiven und negativen Einfluß auf den biologischen Prozeß der Zellzyklusregulation an zwei unabhängigen Zeitpunkten besitzt. JunB-defiziente Fibroblasten weisen einen beschleunigten G₁/S-Übergang und einen verlangsamten Eintritt in die G₂/M-Phasen des Zellzyklus auf. Diese Zellzyklus-Defekte sind ausschließlich auf das Fehlen von JunB zurückzuführen, da sie durch das Einbringen eines posttranslational aktivierbaren JunB-ERTM-Fusionsproteins aufgehoben werden. Damit stellt JunB eine wichtige Verbindung zwischen den Mitogen-aktivierten Signaltransduktionskaskaden und der Zellzyklusregulation dar.

5.1. Die Rolle von JunB im G₁/S-Übergang

Der beschleunigte Übergang von der G₁- in die S-Phase in Abwesenheit von JunB hat als Ursache eine veränderte Expression und Aktivität von wichtigen Zellzyklusregulatoren. Dabei scheint die verfrühte Expression und Aktivität von Zyklin D1 in den *junB*^{-/-}-Zellen bei dem beschleunigten Eintritt in die S-Phase eine zentrale Rol-

le einzunehmen. Mehrere Studien haben deutlich gemacht, daß Änderungen in der Zyklin D1-Expression den Ablauf der G₁-Phase des Zellzyklus beeinflussen. Mikroinjektionsexperimente mit Antikörpern gegen Zyklin D1 oder mit „antisense“-cDNA haben zu einer Blockierung des G₁-Phase-Durchlaufs geführt (Baldin et al., 1993; Tam et al., 1994), während auf der anderen Seite eine Überexpression von Zyklin D1 die G₁-Phase verkürzt (Quelle et al., 1993). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß auch die Zykline D2 und D3 beteiligt sind, die ebenfalls in der G₁-Phase exprimiert werden. Anhand der bisher durchgeführten Studien ist Zyklin D1 eine wichtige Verbindung zwischen extrazellulären Signalen wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren und dem Zellzyklus (Grana und Reddy, 1995; Sherr, 1996). Seine komplexe Regulation ist jedoch noch nicht bis ins Detail geklärt. So kann Zyklin D1 durch c-Jun über die Ras-abhängige Signaltransduktionskaskade aktiviert werden (Herber et al., 1994; Mechta et al., 1997; Albanese et al., 1995; Wisdom et al., 1999; Frame und Balmain, 2000).

Die verfrühte Expression von Zyklin D1 in Abwesenheit von JunB kann einerseits durch eine De-Reprimierung des Zyklin D1-Promotors erklärt werden, da kürzlich mit Hilfe von transienten Transfektionen gezeigt wurde, daß JunB ein Repressor von Zyklin D1 ist (Bakiri et al., 2000). Andererseits kann der Wegfall der negativen Regulationsfunktion von JunB auf c-Jun, das als Aktivator von Zyklin D1 beschrieben worden ist (Wisdom et al., 1999; Bakiri et al., 2000), zu der beobachteten Zyklin D1-Deregulation beitragen.

Transiente Transfektionsstudien in Säugerzellen haben ergeben, daß JunB die c-Jun abhängige Transaktivierung von künstlichen Promotoren hemmt, und damit die c-Jun-abhängige AP-1-Aktivität negativ reguliert (Chiu et al., 1989; Deng et al., 1993). Die Ursache für diese negative Regulation ist wahrscheinlich die bevorzugte Bildung von JunB/c-Jun-Heterodimeren, die mit einer wesentlich geringeren Affinität an die AP-1-Erkennungssequenzen binden als zum Beispiel c-Jun/c-Jun-Homodimere oder c-Jun/ATF-2 Heterodimere. Als Konsequenz davon kommt es zu einer deutlich verringerten Transaktivierung der Zielgene. Da der c-Jun-Promotor selbst zwei AP-1-Erkennungssequenzen enthält, die für eine autoregulative Transkription von c-Jun sorgen (Angel et al., 1988b), könnte auch die Expression von c-Jun direkt durch JunB negativ reguliert werden.

Die Analyse der JunB-defizienten Fibroblasten als außerordentlich spezifisches System zur Funktionsanalyse von JunB ergibt zum ersten Mal eine Erklärung bzw. Unterstützung der transienten Transfektionsdaten (Chiu et al., 1989; Deng et al., 1993). In den *junB*^{-/-}-Zellen ist die postulierte negativ-regulierende Funktion von JunB auf c-Jun aufgehoben, was besonders deutlich an der verlängerten und erhöhten Expression von c-Jun nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (Serum) oder dem Phorbolester TPA und der verfrühten Expression von Zyklin D1 zu sehen ist. Zusätzlich zu dieser veränderten Transaktivierung verstärkt auch die erhöhte Expression von c-Jun selbst die Transkription von Zyklin D1.

Eine weitere direkte Folge der aufgehobenen negativen Regulation von JunB auf c-Jun ist die reduzierte Expression des c-Jun-Zielgens *p53* (Schreiber et al., 1999; Shaulian et al., 2000) in Abwesenheit von JunB. So führt der Wegfall von JunB über die verlängerte und erhöhte Expression von c-Jun zu einer Reduktion der *p53*-Expression und als Folge daraus zu einer verringerten Expression des *p53*-Zielgens *p21^{Cip1}*. Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß eine wesentliche Funktion von *p53* am G₁/S-Übergang in der Regulation des Zellzyklus-Inhibitors *p21^{Cip1}* liegt (Levine, 1997). Hier hemmt *p21^{Cip1}* effektiv die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK3, CDK4 und CDK6, während es die übrigen CDKs nur sehr ineffizient beeinflusst (Gartel und Tyner, 1999). Die deutliche Reduzierung der *p21^{Cip1}*-Expression in den JunB-defizienten Fibroblasten trägt wahrscheinlich zusätzlich zu der erhöhten Zyklin D1-CDK4/CDK6-Aktivität bei.

Einen wesentlich größeren Einfluß auf die Zyklin D1-CDK4/CDK6-Aktivität hat allerdings der spezifische Inhibitor *p16^{Ink4a}* (Serrano, 1997). Im Gegensatz zu der indirekten Regulation von *p21^{Cip1}* stellt der Inhibitor *p16^{Ink4a}* ein direktes transkriptionelles Zielgen von JunB dar (Passegue und Wagner, 2000). Der Promotor von *p16^{Ink4a}* weist fünf mögliche Bindungssequenzen für AP-1 auf, wobei JunB an drei dieser fünf Sequenzen *in vitro* binden kann (Passegue und Wagner, 2000). Die Ergebnisse des komplementären experimentellen Ansatzes der vorliegenden Arbeit sind in guter Übereinstimmung mit diesen Daten, denn der Verlust von JunB führt zu einer stark reduzierten Expression von *p16^{Ink4a}*. Als Folge davon wird die inhibitorische Wirkung von *p16^{Ink4a}* auf die Zyklin D1-CKD4/CDK6-Kinase-Kom-

plexe vermindert. Das Zusammenwirken der reduzierten Menge an Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren und der verstärkten transkriptionellen Aktivierung von Zyklin D1 führt schließlich zu einer gesteigerten Zyklin D1-Kinase-Aktivität.

Diese Aktivierung des Zyklin D1-Kinase-Komplexes wird als Startsignal für die Zellzyklus-Progression gesehen, da eine Überexpression von Zyklin D1 zu einem beschleunigten Durchlaufen der G_1 -Phase führt (Quelle et al., 1993). In Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten, die beschreiben, daß diese Überexpression von Zyklin D1 eine erhöhte Expression von Zyklin E zur Folge hat (Imoto et al., 1997), ist die Expression von Zyklin E in den *junB*^{-/-}-Zellen leicht erhöht. Dieses Ergebnis unterstützt auch das Modell, daß Zyklin E abhängig von Zyklin D1 ist (Geng et al., 1999). Allerdings ist die Zyklin E-Kinase-Aktivität in den JunB-defizienten Fibroblasten nur marginal zu frühen Zeitpunkten des Zellzyklus erhöht, während der Maximalwert nicht erreicht wird. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, daß die spezifischen Inhibitoren für den Zyklin E-Kinase-Komplex (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}) eine gesteigerte Aktivität verhindern. Zwar ist der Inhibitor p21^{Cip1} in Abwesenheit von JunB reduziert, doch treten keine Veränderungen in der Expression von p27^{Kip1} auf.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten haben JunB als einen Repressor des G_1 /S-Übergangs identifiziert. JunB kann als Modulator der c-Jun-Aktivierung, als negativer Regulator von Zyklin D1 und als ein starker transkriptioneller Aktivator des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors p16^{Ink4a} in die Zellzykluskontrolle eingreifen. Da p16^{Ink4a} als Inhibitor fungiert, überwiegt insgesamt die negative Funktion von JunB am G_1 /S-Übergang. Mit der Untersuchung der *junB*^{-/-}-Fibroblasten wurde nachgewiesen, daß JunB *in vivo* gleichzeitig die Funktion eines Repressors und eines starken transkriptionellen Aktivators ausübt, um einen koordinierten G_1 /S-Übergang zu ermöglichen (Abb. 25).

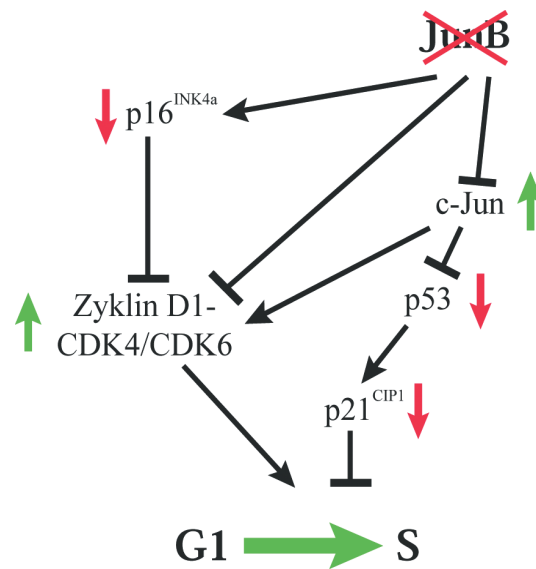


Abb. 25: G₁/S-Übergang in Abwesenheit von JunB.

Der Verlust von JunB führt zu einer reduzierten Expression von p16^{INK4a}, p53 und p21^{Cip1} (rote Pfeile) sowie zu einer verfrühten bzw. verlängerten Aktivierung von Zyklin D1-CDK4/CDK6 bzw. c-Jun (grüne Pfeile). Insgesamt resultieren die Veränderungen in einem beschleunigten Eintritt in die S-Phase (grüner Pfeil). Rote Pfeile symbolisieren die negative bzw. grüne Pfeile die positive Wirkung des JunB Verlusts auf den G₁/S-Übergang.

5.2. Die Rolle von JunB im S/G₂/M-Übergang

Die JunB-defizienten Fibroblasten weisen trotz ihrer gesteigerten Zyklin D1-CDK4/CDK6-Aktivität keine gesteigerte Proliferation im Vergleich zum Wildtyp auf. Die normale Proliferationsrate läßt vielmehr vermuten, daß der Verlust von JunB eine zweite Fehlfunktion im Ablauf des Zellzyklus verursacht, die den beschleunigten G₁/S-Übergang kompensiert.

Es ist denkbar, daß aufgrund des vorzeitigen Eintritts der *junB*^{-/-}-Zellen in die S-Phase nicht alle Faktoren, die für eine normale Replikation der DNA benötigt werden, in ausreichender Menge vorhanden sind. Dadurch könnte es zu einer Verlangsamung im Zellzyklus-Ablauf kommen. Dagegen sprechen allerdings frühere Studien, in denen die Überexpression von Zyklin D1 insgesamt eine höhere Proliferationsrate verursachte und kein kompensatorischer Effekt in der Replikationsphase aufgrund des beschleunigten G₁/S-Übergangs gefunden werden konnte (Quelle et al., 1993).

Im Gegensatz zu diesen Zyklin D1 Überexpressionsstudien weisen die JunB-defizienten Fibroblasten zusätzlich zum frühen Eintritt in die S-Phase eine signifikante Verlangsamung beim Übergang von der S- in die G₂/M-Phasen auf. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß JunB als Regulator der späten Zellzyklusphasen benötigt wird.

Die Durchwanderung des Zellzyklus von der S- in die G₂-Phase und weiter in die Mitose wird hauptsächlich durch die Aktivität der Zyklin A-CDK2- und Zyklin B-CDC2 Kinase-Komplexe reguliert (Desdouets et al., 1995a; Furuno et al., 1999). Dabei ist Zyklin A-CDK2 ein entscheidender Faktor bei der DNA-Synthese und für den Eintritt der Zellen in die Mitose, während Zyklin B-CDC2 für den Ablauf der Mitose wichtig ist, insbesondere für die Auflösung der Kernmembran und den Aufbau der Mitosespindel (Furuno et al., 1999). Die Mikroinjektion von Antikörpern gegen Zyklin A oder „antisense“-RNA verhindert die DNA-Replikation in Säuger-Zellen, während die Blockierung der Zyklin A-CDK2-Aktivität in der Mitose deutlich macht, daß der Komplex für die Aktivierung und die Translokation von Zyklin B-CDC2 benötigt wird (Girard et al., 1991; Zindy et al., 1992; Furuno et al., 1999).

In Abwesenheit von JunB sind sowohl die Zyklin A-CDK2 als auch die Zyklin B-CDC2 Kinase-Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp reduziert bzw. zeitlich verzögert. Es ist dabei sehr wahrscheinlich, daß die veränderte Zyklin A-CDK2 Kinase-Aktivität durch die in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten beobachtete veränderte Expression von Zyklin A hervorgerufen wird. Die Veränderung in der Zyklin A-CDK2 Kinase-Aktivität ist wahrscheinlich auch der Grund für die veränderte Aktivität von Zyklin B-CDC2 in diesen Fibroblasten, da frühere Studien nachgewiesen haben, daß die Translokation und damit die Funktion von Zyklin B-CDC2 durch Zyklin A-CDK2 gesteuert wird (Furuno et al., 1999).

Ein primärer Angriffspunkt könnte somit die Zellzyklus-restringierte Regulation von Zyklin A sein. Die Zyklin A-Expression ist während des Zellzyklusablaufs sehr präzise kontrolliert und nur während einer kurzen Phase durch die Adenylat-Zyklase-Signaltransduktionskaskade induzierbar. Diese Induktion wird hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie gesteuert, die an eine CREB-Erkennungssequenz (CRE) im Zyklin A-Promotor angreifen (Desdouets et al., 1995b). Neben den CREB Proteinen können auch einige Mitglieder der AP-1 Transkriptions-

faktor-Familie mit niedriger Affinität an diese CRE-Sequenz binden (Ryseck und Bravo, 1991; Karin und Smeal, 1992). Untersuchungen der Zyklin A-Induktion in Rattenzellen haben Hinweise dafür ergeben, daß die Promotor-Aktivierung zum Teil durch ATF-2- und Jun-Proteine, hauptsächlich JunD, reguliert wird (Shimizu et al., 1998). Diese binden an eine CRE-Sequenz im *Zyklin A*-Promotor der Ratte und induzieren eine AP-1-abhängige Transaktivierung. Allerdings weisen *junD*^{-/-}-Zellen keinen Zyklin A-Defekt auf (Weitzman et al., 2000), womit die alleinige Rolle von JunD bei der Zyklin A-Regulation in Frage gestellt wird. Es ist aber nicht auszuschließen, daß bestimmte AP-1-Proteine zusammen mit den CREB-Proteinen den Zyklin A-Promotor regulieren.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Protein/DNA-Bindungsstudien (EMSA) bestätigen die vermutete Rolle von AP-1 in der Zyklin A Regulation. In Wildtyp-Fibroblasten bindet ein AP-1-Komplex, in dem c-Jun und JunB nachgewiesen werden konnten, an die murine *Zyklin A*-CRE-Sequenz, wogegen AP-1 Proteine in Extrakten von JunB-defizienten Fibroblasten komplett fehlen. Der funktionelle Beweis, daß JunB an der Regulation von Zyklin A entscheidend beteiligt ist, konnte durch Koexpressionsstudien in F9 Teratokarzinomzellen erbracht werden. Kotransfizierte und -exprimierte c-Jun- und JunB- Proteine aktivieren den murinen *Zyklin A*-Promotor, während c-Jun und JunB alleine fast keinen Effekt haben.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist es denkbar, daß c-Jun/ATF2- und vor allem JunB/ATF2-Dimere für die Zeitpunkt-abhängige Regulation von Zyklin A gebraucht werden. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, daß JunB, im Gegensatz zu c-Jun, durch die gleiche Adenylat-Zyklase-Signaltransduktionskaskade stark induziert wird, die wahrscheinlich die Zellzyklus-abhängige Expression von Zyklin A steuert (Desdouets et al., 1995b). Diese übereinstimmende Regulation von JunB und Zyklin A über cAMP stellt ein weiteres Argument für die regulatorische Aufgabe von JunB in der Zyklin A-Expression dar.

Die zeitlich gesteuerte Expression von Zyklin A im Verlauf des Zellzyklus wird vermutlich durch eine wechselnde Kooperation mehrerer Transkriptionsfaktoren, die an den Zyklin A-Promotor binden können, reguliert (Abb. 17; Desdouets et al., 1995b). Daraus kann die Hypothese aufgestellt werden, daß die Induzierbarkeit zu späteren Zeitpunkten im Zellzyklus durch die Änderung der Zusammensetzung der Kooperationspartner gewährleistet wird.

Die Untersuchung der *junB*^{-/-}-Fibroblasten hat einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulation von Zyklin A im Verlauf des Zellzyklus geleistet. Sie macht deutlich, daß JunB als ein wichtiger positiver Faktor bei der zeitgerechten Induktion von Zyklin A fungiert. Indirekt ist JunB damit auch an der Regulation der Aktivität von Zyklin B-CDC2 als Ziel von Zyklin A-CDK2 beteiligt. Der Verlust von JunB führt zu einer ineffizienten Aktivität von Zyklin A-CDK2 und Zyklin B-CDC2 und damit zu einer Verlangsamung der Progression durch die S- und G₂/M-Phasen (Abb. 26).

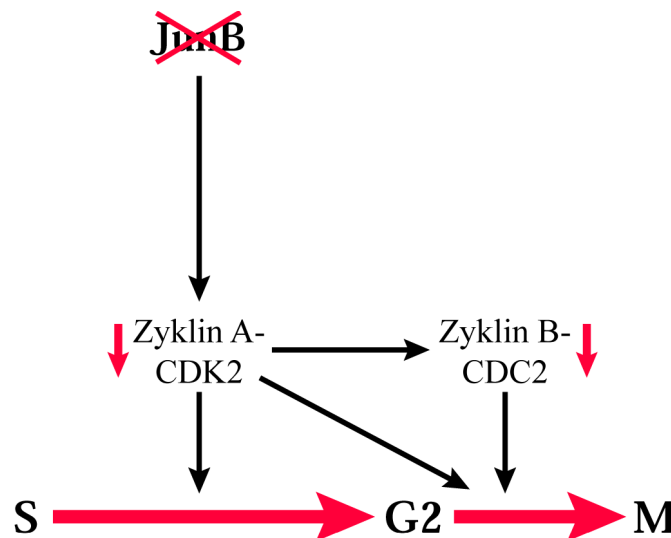


Abb. 26: Zellzyklus-Progression durch die S- und G₂/M Phasen.

In den späten Phasen des Zellzyklus führt der Verlust von JunB zu einer Reduktion der Zyklin A-CDK2- und Zyklin B-CDC2-Aktivität, die einen verlangsamten Durchlauf durch die späten Phasen des Zellzyklus zur Folge hat (rote Pfeile).

5.3. Der Verlust von JunB verursacht die Zellzyklusdefekte

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien in den JunB-überexprimierenden Fibroblasten sind ein weiterer Beweis für bedeutende Funktionen von JunB im geordneten Zellzyklus-Ablauf und unterstützen parallel zur Fertigstellung dieser Arbeit veröffentlichte Daten, die einen Einfluß von JunB auf den G₁/S-Übergang nachweisen (Bakiri et al., 2000; Passegue und Wagner, 2000). Die JunB überexprimierenden Fibroblasten sind gekennzeichnet durch eine verlangsamte Proliferation und eine vergrößerte G₁-Population. Die Ursache für diese Effekte ist der Anstieg in der Expression des spezifischen Zyklin D1-CDK4/CDK6-Inhibitors

p16^{Ink4a} (Passegue und Wagner, 2000). Ein Defekt im Ablauf der S-Phase ist nicht festzustellen. Eine mögliche Erklärung für diesen unbeeinflussten Ablauf trotz der Überexpression von JunB ist, daß für die aktivierende Funktion von JunB auf Zyklin A geringe Proteinmengen ausreichen, da die Wirkung auf diesen Zielpromotor in Kooperation mit anderen Proteinen geschieht (z.B. c-Jun/ATFs). Im Gegensatz dazu steht die Transkription des Zellzyklus-Inhibitors p16^{Ink4a}, die in Abhängigkeit von der Menge an JunB reguliert wird (Passegue und Wagner, 2000).

Die beobachteten Veränderungen im Zellzyklus der JunB-defizienten Fibroblasten werden ausschließlich durch den Verlust von JunB hervorgerufen. Sekundäre Mutationen, die im Verlauf der Immortalisierung der Zellen entstanden sein könnten, können durch die Wiedereinbringung eines posttranslationell aktivierbaren JunB-ERTM-Fusionsproteins in diese Fibroblasten ausgeschlossen werden. Durch Aktivierung dieses JunB-ERTM-Fusionsproteins mit dem spezifischen Aktivator 4-Hydroxy-Tamoxifen kann eine fast vollständige Revertierung des veränderten Zellzyklusprofils erreicht werden. Der Anteil der S-Phase Population kann fast auf Wildtyp-Niveau reduziert werden, während auch gleichzeitig wieder mehr Zellen in den G₁- und G₂/M-Populationen anzutreffen sind.

Auch die Expression von p16^{Ink4a} und Zyklin A ist in den stabilen *junB*^{-/-} / *junB-ER*TM-Zellen vergleichbar mit der Wildtyp-Expression. Insbesondere Zyklin A wird wieder zum richtigen Zeitpunkt im Zellzyklus induziert, was bedeutet, daß JunB für die zeitgesteuerte Expression von Zyklin A benötigt wird.

Allerdings kann der Zellzyklus-Phänotyp der *junB*^{-/-}-Fibroblasten nicht vollständig auf das Wildtyp-Niveau revertiert werden. Dies ist jedoch auf die niedrige Expression des Fusionsproteins in den ausgewählten stabilen *junB*^{-/-} / *junB-ER*TM-Zelllinien zurückzuführen. Die Auswahl dieser schwach exprimierenden Zelllinien war jedoch notwendig, um eine möglichst niedrige Hintergrundaktivität des Fusionsproteins zu erreichen, wodurch mögliche Sekundäreffekte von JunB-ERTM-Abbauprodukten vermieden werden konnten.

5.4. Duale Rolle von JunB in der Zellzyklusregulation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, daß JunB keine redundante AP-1 Untereinheit darstellt, sondern unverzichtbare negative und positive Funktionen während des Zellzyklus-Ablaufs besitzt (Abb. 27). Eine insgesamt ne-

gative Funktion von JunB wird am G₁/S-Übergang festgestellt, indem es die c-Jun Aktivierung inhibiert, die Expression des Inhibitors p16^{Ink4a} aktiviert und die Zyklin D1-Expression und -Aktivität negativ reguliert. Im Gegensatz dazu steht die positive Funktion von JunB in der S-Phase des Zellzyklus, wo JunB für die zeitgerechte Aktivierung von Zyklin A benötigt wird.

Die Ausübung dieser gegensätzlichen Funktionen von JunB bei der Zellzyklusregulation ist als einzigartig anzusehen, denn bisher ist nur von den Inhibitoren der CIP/KIP Familie bekannt, daß sie sowohl einen negativen als auch positiven Einfluß auf die Zellzyklusregulation haben können. So fördern p21^{Cip1} und p27^{Kip1} die Assoziierung der Zyklin D-CDK-Kinase-Komplexe während die Zyklin E- und auch die Zyklin A-Kinase-Aktivität hemmen (Sherr und Roberts, 1999). Die JunB-Funktionen auf die Zellzyklusregulatoren p16^{Ink4a} und Zyklin A sind unabhängig von den kürzlich beschrieben Funktionen von c-Jun (Schreiber et al., 1999; Shaulian et al., 2000) sowie vom Einfluß von JunB auf c-Jun und stellen eine weitere Verbindung zwischen den mitogenen-Signaltransduktionskaskaden und der Regulation des Zellzyklus her

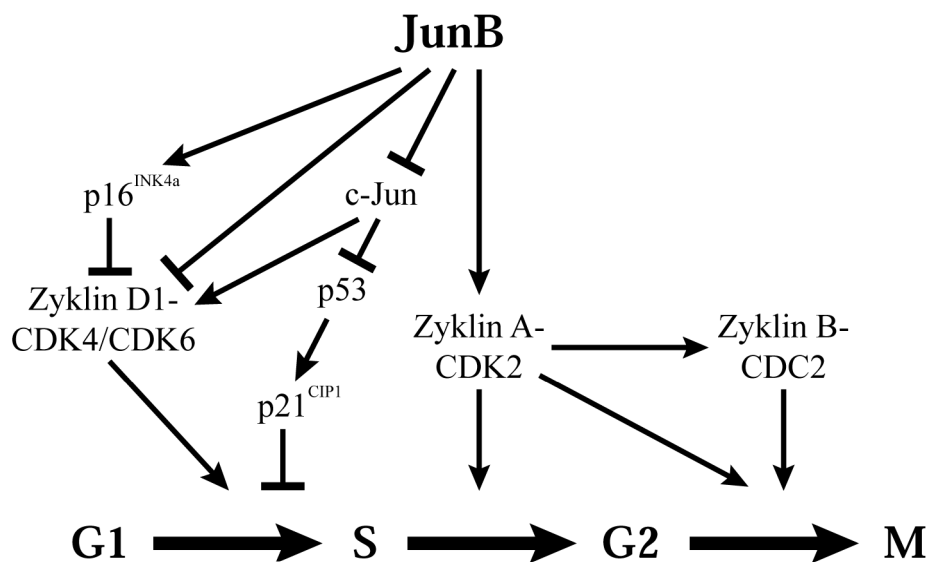


Abb. 27: Modell für die positiven und negativen Funktionen von JunB im Zellzyklusablauf.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden sehr vielversprechende Zellsysteme etabliert und charakterisiert (*junB*^{-/-}; *junB*^{-/-} / *JunB-ER*TM), in denen man neben der Kontrolle der Zellproliferation weitere JunB-gesteuerte Genprogramme einer Zelle (Differenzierung, Transformation und Apoptose) definieren kann.

Zahlreiche Studien haben die Expression von JunB mit Differenzierungsprozessen assoziiert (Melamed et al., 1993; Schlingensiepen et al., 1993; Li et al., 1999), wobei der Differenzierung oftmals ein Wachstumsarrest vorausgeht. In Übereinstimmung mit dieser Annahme können Wachstumsinhibitoren ihrerseits JunB induzieren (Hashimoto et al., 1993; Nishina et al., 1993). Im Gegensatz zu JunB wird die Expression des nahe verwandten Proteins c-Jun zumeist mit Proliferation assoziiert und kann sogar bei Überexpression die Differenzierung hemmen (Su et al., 1991). Die Entscheidung einer Zelle zu proliferieren oder zu differenzieren könnte daher von der Stöchiometrie der in der Zelle vorkommenden c-Jun- und JunB-Moleküle abhängen. Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Einfluß von JunB auf c-Jun unterstützt diese These ebenso wie parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführte Studien mit den JunB-defizienten sowie den *junB*^{-/-} / *JunB-ER*TM-Fibroblasten in einem *in vitro* Hautmodel. Dieser Ansatz führte zur Entdeckung einer antagonistischen Funktion von JunB und c-Jun bei der Fibroblasten-abhängigen parakrinen Regulation der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten (Szabowski et al., 2000).

Unkontrolliertes Wachstum und oftmals auch eine damit einhergehende Dedifferenzierung sind Voraussetzung für die Entstehung von Tumoren. So kann die veränderte Expression von Zellzyklus-Regulatoren zum unkontrollierten Wachstum von Zellen und als Folge zur Tumorentstehung führen (Lukas et al., 1995). Die in der vorgelegten Arbeit dargestellte JunB-abhängige veränderte Expression der Tumorsuppressoren p53 und p16^{Ink4a} und des Proto-Onkoproteins c-Jun sind ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von JunB an der Tumorentwicklung. Diese Vermutung wird durch vorläufige, im Verlauf dieser Arbeit angestellte Beobachtungen unterstützt, nach denen die *junB*^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Fibroblasten eine erhöhte spontane Transformationsrate besitzen könnten. Parallel dazu wurde erst kürzlich beschrieben, daß überexprimiertes JunB in Fibroblasten der Maus die Transformation durch aktiviertes Ras und das Tumorstadium hem-

men kann (Passegue und Wagner, 2000), während der Verlust von JunB in myeloiden Vorläuferzellen zu einer Art chronischer myeloider Leukämie führt (Passegue et al., 2001). Diese Befunde deuten darauf hin, daß JunB als anti-Onkogen fungieren kann.

Krankheitszustände und physiologische Störungen, die zur Tumorentstehung beitragen, können von einer Zelle dadurch verhindert werden, daß sie eine sogenannte Selbstmord-Signaltransduktionskaskade auslöst, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Apoptose ist ein lebensnotwendiger Prozeß während der Embryonalentwicklung sowie beim physiologischen Umbau von Geweben in adulten Organen. Eine Funktion von AP-1 bei der Apoptose wurde schon sehr früh vermutet, da *c-fos*- und *c-jun*-mRNAs in zytokinabhängigen lymphoiden Zellen nach Wachstumsfaktorentzug schnell und transient induziert werden (Colotta et al., 1992). In Übereinstimmung damit erlauben „antisense“- Oligonukleotide gegen *c-fos* und *c-jun* ein verlängertes Überleben dieser lymphoiden Zellen. Neuere Untersuchungen identifizieren einen zelltypabhängigen pro- oder auch anti-apoptotischen Einfluß der AP-1-Untereinheiten c-Fos und c-Jun (Schreiber et al., 1995; Ivanov und Nikolic-Zugic, 1997; Ham et al., 1995; Bossy-Wetzel et al., 1997; Kolbus et al., 2000). Vorläufige Experimente im Verlauf dieser Arbeit ergaben, daß die JunB-defizienten Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich reduziertes apoptotisches Verhalten nach Wachstumsfaktorentzug aufweisen. Diese Beobachtung und noch wichtiger die hier gezeigte veränderte Expression von p53, c-Jun und Zyklin D1, die nachweislich einen Einfluß auf die Apoptose haben, sind ein deutlicher Hinweis auf mögliche JunB-abhängige Funktionen während der Apoptose. Diese Funktionen können künftig mit Hilfe der *junB*^{-/-} / *JunB-ER*TM -Zelllinien weiter spezifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden somit eine Basis für weiterführende detaillierte Untersuchungen der JunB-spezifischen Funktionen bei diesen biologischen Prozessen, wobei die in dieser Arbeit etablierten *junB*^{-/-} / *JunB-ER*TM - und die *junB*^{-/-} -Zelllinien wertvolle Werkzeuge darstellen.

7. Literaturverzeichnis

- Aho, S., Rouda, S., Kennedy, S. H., Qin, H., Tan, E. M. (1997). Regulation of human interstitial collagenase (matrix metalloproteinase- 1) promoter activity by fibroblast growth factor, *Eur. J. Biochem.* 247, 503-10.
- Albanese, C., D'Amico, M., Reutens, A. T., Fu, M., Watanabe, G., Lee, R. J., Kitsis, R. N., Henglein, B., Avantaggiati, M., Somasundaram, K., et al. (1999). Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis, *J. Biol. Chem.* 274, 34186-95.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., Pestell, R. G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions, *J. Biol. Chem.* 270, 23589-97.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T., Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP- 1, *Nature* 332, 166-71.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region, *Mol. Cell. Biol.* 7, 2256-66.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1, *Cell* 55, 875-85.
- Angel, P., Herrlich, P. (1994). The Fos and Jun families of transcription factors, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor, *Cell* 49, 729-39.
- Angel, P., Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-57.
- Annweiler, A., Zwilling, S., Wirth, T. (1994). Functional differences between the Oct2 transactivation domains determine the transactivation potential of individual Oct2 isoforms, *Nucleic Acids Res.* 22, 4250-8.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein- protein interactions, *Mol. Cell. Biol.* 17, 3094-102.

- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression, *Embo J.* 19, 2056-2068.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes Dev.* 7, 812-21.
- Bartek, J., Bartkova, J., Lukas, J. (1997). The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer, *Exp. Cell Res.* 237, 1-6.
- Benbrook, D. M., Jones, N. C. (1990). Heterodimer formation between CREB and JUN proteins, *Oncogene* 5, 295-302.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscott, S. J., Weintraub, H., Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association, *Cell* 68, 507-19.
- Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., Wrighton, C., Busslinger, M. (1995). Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron, *Mol. Cell. Biol.* 15, 3748-58.
- Berstine, E. G., Hooper, M. L., Grandchamp, S., Ephrussi, B. (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3899-903.
- Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun, *Embo J.* 16, 1695-709.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M., Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity, *Cell* 64, 573-84.
- Brown, J. R., Ye, H., Bronson, R. T., Dikkes, P., Greenberg, M. E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB, *Cell* 86, 297-309.
- Cano, E., Mahadevan, L. C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs, *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-22.
- Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4, *Mol. Cell. Biol.* 15, 2682-8.
- Chen, I. T., Akamatsu, M., Smith, M. L., Lung, F. D., Duba, D., Roller, P. P., Fornace, A. J., Jr., O'Connor, P. M. (1996). Characterization of p21Cip1/Waf1 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction, *Oncogene* 12, 595-607.
- Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W., Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA, *Nature* 374, 386-8.

- Chiu, R., Angel, P., Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun, *Cell* 59, 979-86.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162, 156-9.
- Clohisy, J. C., Scott, D. K., Brakenhoff, K. D., Quinn, C. O., Partridge, N. C. (1992). Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells, *Mol. Endocrinol.* 6, 1834-42.
- Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M., Mantovani, A. (1992). Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines, *J. Biol. Chem.* 267, 18278-83.
- Crowe, D. L., Brown, T. N. (1999). Transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity by a c-fos/estrogen receptor fusion protein is mediated by the proximal AP-1 site of the MMP-9 promoter and correlates with reduced tumor cell invasion, *Neoplasia* 1, 368-72.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell* 82, 675-84.
- Deng, T., Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers, *Genes Dev.* 7, 479-90.
- Desdouets, C., Matesic, G., Molina, C. A., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C., Sobczak-Thépot, J. (1995a). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP- responsive transcription factors CREB and CREM, *Mol. Cell. Biol.* 15, 3301-9.
- Desdouets, C., Sobczak-Thépot, J., Murphy, M., Brechot, C. (1995b). Cyclin A: function and expression during cell proliferation, *Prog. Cell Cycle Res.* 1, 115-23.
- Dorsey, M. J., Tae, H. J., Sollenberger, K. G., Mascarenhas, N. T., Johansen, L. M., Taparowsky, E. J. (1995). B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family, *Oncogene* 11, 2255-65.
- Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., Weinberg, R. A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins, *Cell* 73, 499-511.
- Downward, J. (1997). Cell cycle: routine role for Ras, *Curr. Biol.* 7, R258-60.
- Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., Reed, S. I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest, *Cell* 76, 1013-23.

- Dulic, V., Lees, E., Reed, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase, *Science* 257, 1958-61.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* 75, 817-25.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J., Livingston, D. M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D- type cyclins, *Cell* 73, 487-97.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., el Sabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P., Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family, *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-42.
- Frame, S., Balmain, A. (2000). Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 106-13.
- Furuno, N., den Elzen, N., Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase, *J. Cell Biol.* 147, 295-306.
- Gartel, A. L., Tyner, A. L. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene, *Exp. Cell Res.* 246, 280-9.
- Geng, Y., Whoriskey, W., Park, M. Y., Bronson, R. T., Medema, R. H., Li, T., Weinberg, R. A., Sicinski, P. (1999). Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E, *Cell* 97, 767-77.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts, *Cell* 67, 1169-79.
- Goetz, J., Chatton, B., Mattei, M. G., Keding, C. (1996). Structure and expression of the ATFa gene, *J. Biol. Chem.* 271, 29589-98.
- Grana, X., Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs), *Oncogene* 11, 211-9.
- Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H. A., Wagner, E. F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling, *Science* 266, 443-8.
- Groskopf, J. C., Linzer, D. I. (1994). Characterization of a delayed early serum response region, *Mol. Cell. Biol.* 14, 6013-20.

- Gruda, M. C., van Amsterdam, J., Rizzo, C. A., Durham, S. K., Lira, S., Bravo, R. (1996). Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice, *Oncogene* 12, 2177-85.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function, *Genes Dev.* 8, 2939-52.
- Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M., Boyd, D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen- activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences, *J. Biol. Chem.* 271, 10672-80.
- Hai, T., Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3720-4.
- Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C. M., Lallemand, D., Yaniv, M., Rubin, L. L. (1995). A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death, *Neuron* 14, 927-39.
- Hannon, G. J., Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest, *Nature* 371, 257-61.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases, *Cell* 75, 805-16.
- Hashimoto, M., Gaddy-Kurten, D., Vale, W. (1993). Protooncogene junB as a target for activin actions, *Endocrinology* 133, 1934-40.
- Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Ruther, U., Wagner, E. F., Thoenen, H. (1990). Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c- fos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3899-903.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M., Muller, R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter, *Oncogene* 9, 1295-304.
- Herr, I., van Dam, H., Angel, P. (1994). Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation, *Carcinogenesis* 15, 1105-13.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., Wagner, E. F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis, *Nature* 365, 179-81.

- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A., Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6, *Mol. Cell. Biol.* 15, 2672-81.
- Hsu, J. C., Laz, T., Mohn, K. L., Taub, R. (1991). Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3511-5.
- Hunter, T., Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age, *Cell* 79, 573-82.
- Imoto, M., Doki, Y., Jiang, W., Han, E. K., Weinstein, I. B. (1997). Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events, *Exp. Cell Res.* 236, 173-80.
- Ivanov, V. N., Nikolic-Zugic, J. (1997). Transcription factor activation during signal-induced apoptosis of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. A protective role of c-Fos, *J. Biol. Chem.* 272, 8558-66.
- Johnson, D. G., Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer, *Front. Biosci.* 3, d447-8.
- Johnson, R. S., Spiegelman, B. M., Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene, *Cell* 71, 577-86.
- Johnson, R. S., van Lingen, B., Papaioannou, V. E., Spiegelman, B. M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture, *Genes Dev.* 7, 1309-17.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone, *Cell* 62, 1189-204.
- Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C. H., ten Dijke, P., Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer, *J. Biol. Chem.* 273, 21145-52.
- Karin, M. (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 415-24.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.* 270, 16483-6.
- Karin, M., Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus, *Curr. Biol.* 5, 747-57.
- Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-6.

- Karin, M., Smeal, T. (1992). Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end, *Trends Biochem. Sci.* 17, 418-22.
- Kerr, L. D., Holt, J. T., Matrisian, L. M. (1988). Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways, *Science* 242, 1424-7.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza, B. R., Roberts, J. M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle, *Science* 257, 1689-94.
- Kolbus, A., Herr, I., Schreiber, M., Debatin, K. M., Wagner, E. F., Angel, P. (2000). c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents, *Mol. Cell. Biol.* 20, 575-82.
- Kouzarides, T., Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction, *Nature* 336, 646-51.
- Kovary, K., Bravo, R. (1991). The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.* 11, 4466-72.
- Kyriakis, J. M., Avruch, J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation, *J. Biol. Chem.* 271, 24313-6.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-5.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science* 240, 1759-64.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution, *Genes Dev.* 9, 639-49.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40, *Nature* 325, 368-72.
- Lee, W., Mitchell, P., Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements, *Cell* 49, 741-52.
- Leevers, S. J., Paterson, H. F., Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane, *Nature* 369, 411-4.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 88, 323-31.
- Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., Flavell, R. A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation, *Embo J.* 18, 420-32.

- Li, L., Chambard, J. C., Karin, M., Olson, E. N. (1992). Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression, *Genes Dev.* 6, 676-89.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., al-Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D., Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity, *Cell* 70, 777-89.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lukas, J., Aagaard, L., Strauss, M., Bartek, J. (1995). Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control, *Cancer Res.* 55, 4818-23.
- Mahfoudi, A., Roulet, E., Dauvois, S., Parker, M. G., Wahli, W. (1995). Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4206-10.
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M. F., Marshall, C. J. (1998). Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C, *Science* 280, 109-12.
- Marshall, C. J. (1995). Opportunities for pharmacological intervention in the ras pathway, *Ann. Oncol.* 6, 63-7.
- Matsui, M., Tokuhara, M., Konuma, Y., Nomura, N., Ishizaki, R. (1990). Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation, *Oncogene* 5, 249-55.
- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W., Elledge, S. J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene, *Genes Dev.* 9, 650-62.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 14, 2066-76.
- Mechta, F., Lallemand, D., Pfarr, C. M., Yaniv, M. (1997). Transformation by ras modifies AP1 composition and activity, *Oncogene* 14, 837-47.
- Melamed, D., Resnitzky, D., Haimov, I., Levy, N., Pfarr, C. M., Yaniv, M., Kimchi, A. (1993). Interleukin 6 induces DNA binding activity of AP1 in M1 myeloblastic cells but not in a growth resistant cell derivative, *Cell Growth Differ.* 4, 689-97.
- Meyerson, M., Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner, *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077-86.
- Minden, A., Karin, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases, *Biochim. Biophys. Acta* 1333, F85-104.

- Miner, J. N., Yamamoto, K. R. (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element, *Genes Dev.* 6, 2491-501.
- Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F., Johnsen, M. (1991). Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity, *Oncogene* 6, 1583-92.
- Nevins, J. R., Chellappan, S. P., Mudryj, M., Hiebert, S., Devoto, S., Horowitz, J., Hunter, T., Pines, J. (1991). E2F transcription factor is a target for the RB protein and the cyclin A protein, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56, 157-62.
- Ng, D. C., Shafaei, S., Lee, D., Bikle, D. D. (2000). Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter, *J. Biol. Chem.* 275, 24080-8.
- Nishina, Y., Sumi, T., Iwai, S. A., Kosaka, M., Nishimune, Y. (1993). The induction of jun genes during the reversible changes induced with sodium butyrate on the differentiation of F9 cells, *Exp. Cell Res.* 208, 492-7.
- Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., Kawai, S. (1989). v-maf, a viral oncogene that encodes a „leucine zipper“ motif, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7711-5.
- Ohtsubo, M., Roberts, J. M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts, *Science* 259, 1908-12.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition, *Mol. Cell. Biol.* 15, 2612-24.
- Oshima, R. G., Abrams, L., Kulesh, D. (1990). Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells, *Genes Dev.* 4, 835-48.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, V., Ansorge, W., Bartek, J., Draetta, G. (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts, *J. Cell Biol.* 121, 101-11.
- Pankov, R., Neznanov, N., Umezawa, A., Oshima, R. G. (1994). AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid- dependent induction of keratin 18 in embryonic cells, *Mol. Cell. Biol.* 14, 7744-57.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation, *Science* 246, 603-8.
- Passequé, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-Steinlein, U., Wagner, E. F. (2001). Chronic Myeloid Leukemia with Increased Granulocyte Progenitors in Mice Lacking JunB Expression in the Myeloid Lineage, *Cell* 104, 21-32.
- Passequé, E., Wagner, E. F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression, *Embo J.* 19, 2969-79.

- Pfarr, C. M., Mechta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S., Yaniv, M. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras, *Cell* 76, 747-60.
- Phillips, M. A., Qin, Q., Rice, R. H. (2000). Identification of an involucrin promoter transcriptional response element with activity restricted to keratinocytes, *Biochem. J.* 348 Pt 1, 45-53.
- Pines, J., Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B, *Nature* 346, 760-3.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals, *Cell* 78, 59-66.
- Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F., Sherr, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts, *Genes Dev.* 7, 1559-71.
- Reichardt, H. M., Kaestner, K. H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., Schutz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival, *Cell* 93, 531-41.
- Reimold, A. M., Grusby, M. J., Kosaras, B., Fries, J. W., Mori, R., Maniwa, S., Clauss, I. M., Collins, T., Sidman, R. L., Glimcher, M. J., Glimcher, L. H. (1996). Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice, *Nature* 379, 262-5.
- Rhodes, K., Oshima, R. G. (1998). A regulatory element of the human keratin 18 gene with AP-1-dependent promoter activity, *J. Biol. Chem.* 273, 26534-42.
- Riabowol, K., Schiff, J., Gilman, M. Z. (1992). Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 157-61.
- Ryseck, R. P., Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins, *Oncogene* 6, 533-42.
- Ryseck, R. P., Hirai, S. I., Yaniv, M., Bravo, R. (1988). Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts, *Nature* 334, 535-7.
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11217-22.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response, *Cell* 78, 963-72.

- Schlingensiepen, K. H., Schlingensiepen, R., Kunst, M., Klinger, I., Gerdes, W., Seifert, W., Brysch, W. (1993). Opposite functions of jun-B and c-jun in growth regulation and neuronal differentiation, *Dev. Genet.* 14, 305-12.
- Schorpp, M., Jager, R., Schellander, K., Schenkel, J., Wagner, E. F., Weiher, H., Angel, P. (1996). The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice, *Nucleic Acids Res.* 24, 1787-8.
- Schorpp, M., Mattei, M. G., Herr, I., Gack, S., Schaper, J., Angel, P. (1995). Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene, *Biochem. J.* 308, 211-7.
- Schorpp-Kistner, M., Wang, Z. Q., Angel, P., Wagner, E. F. (1999). JunB is essential for mammalian placentation, *Embo J.* 18, 934-48.
- Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P., Wagner, E. F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response, *Embo J.* 14, 5338-49.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent, *Genes Dev.* 13, 607-19.
- Schreiber, M., Wang, Z., Jochum, W., Fetka, I., Elliott, C., Wagner, E. F. (2000). Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1, *Development* 127, 4937-48.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor, *Cell* 62, 1217-26.
- Schütte, J., Viallet, J., Nau, M., Segal, S., Fedorko, J., Minna, J. (1989). jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun, *Cell* 59, 987-97.
- Serrano, M. (1997). The tumor suppressor protein p16INK4a, *Exp. Cell Res.* 237, 7-13.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., Karin, M. (2000). The mammalian UV response. c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest, *Cell* 103, 897-907.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue, *Cell* 79, 551-5.
- Sherr, C. J. (1995). Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression, *Proc. Assoc. Am. Physicians* 107, 181-6.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles, *Science* 274, 1672-7.
- Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.* 13, 1501-12.

- Shimizu, M., Nomura, Y., Suzuki, H., Ichikawa, E., Takeuchi, A., Suzuki, M., Nakamura, T., Nakajima, T., Oda, K. (1998). Activation of the rat cyclin A promoter by ATF2 and Jun family members and its suppression by ATF4, *Exp. Cell Res.* 239, 93-103.
- Smeal, T., Angel, P., Meek, J., Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes, *Genes Dev.* 3, 2091-100.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Grover-Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U. R., Karin, M. (1992). Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73, *Mol. Cell. Biol.* 12, 3507-13.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73, *Nature* 354, 494-6.
- Smith, D. B., Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase, *Gene* 67, 31-40.
- Smith, M. J., Prochownik, E. V. (1992). Inhibition of c-jun causes reversible proliferative arrest and withdrawal from the cell cycle, *Blood* 79, 2107-15.
- Stein, B., Baldwin, A. S., Jr., Ballard, D. W., Greene, W. C., Angel, P., Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function, *Embo J.* 12, 3879-91.
- Su, H. Y., Bos, T. J., Montecarlo, F. S., Vogt, P. K. (1991). Jun inhibits myogenic differentiation, *Oncogene* 6, 1759-66.
- Swaroop, A., Xu, J. Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C., Agarwal, N. (1992). A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 266-70.
- Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E., Angel, P. (2000). c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin [In Process Citation], *Cell* 103, 745-55.
- Tam, S. W., Theodoras, A. M., Shay, J. W., Draetta, G. F., Pagano, M. (1994). Differential expression and regulation of Cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression, *Oncogene* 9, 2663-74.
- Teurich, S., Angel, P. (1995). The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites, *Chem. Senses* 20, 251-5.
- Thepot, D., Weitzman, J. B., Barra, J., Segretain, D., Stinnakre, M. G., Babinet, C., Yaniv, M. (2000). Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function, *Development* 127, 143-53.

- Thomas, D. B., Lingwood, C. A. (1975). A model of cell cycle control: effects of thymidine on synchronous cell cultures, *Cell* 5, 37-42.
- Todaro, G. J., Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, *J. Cell Biol.* 17, 299-313.
- Toyoshima, H., Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21, *Cell* 78, 67-74.
- Treier, M., Staszewski, L. M., Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain, *Cell* 78, 787-98.
- Tsai, L. H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E., Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells, *Oncogene* 8, 1593-602.
- Tuckermann, J. P., Reichardt, H. M., Arribas, R., Richter, K. H., Schutz, G., Angel, P. (1999). The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin, *J. Cell Biol.* 147, 1365-70.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., van der Eb, A. J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein, *Embo J.* 12, 479-87.
- van den Heuvel, S., Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science* 262, 2050-4.
- Vogt, P. K., Bos, T. J. (1990). jun: oncogene and transcription factor, *Adv. Cancer Res.* 55, 1-35.
- Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U., Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos, *Nature* 360, 741-5.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell* 81, 323-30.
- Weitzman, J. B., Fiette, L., Matsuo, K., Yaniv, M. (2000). JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis, *Mol. Cell.* 6, 1109-19.
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Ryseck, R. P., Bravo, R. (1989). Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse, *Development* 106, 465-71.
- Wisdom, R., Johnson, R. S., Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms, *Embo J.* 18, 188-97.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature* 366, 701-4.

- Yang-Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein- protein interaction, *Cell* 62, 1205-15.
- Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R. P., Schuermann, M., Muller, R., Bravo, R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity, *Embo J.* 8, 805-13.
- Ziff, E. B. (1990). Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site, *Trends Genet.* 6, 69-72.
- Zindy, F., Lamas, E., Chenivresse, X., Sobczak, J., Wang, J., Fesquet, D., Henglein, B., Brechot, C. (1992). Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1144-54.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Peter Angel, der mich in seine Abteilung aufgenommen, mir die Verwirklichung dieses Forschungsprojekts ermöglicht und immerwährend seine Bereitschaft bekundet hat, Ergebnisse und Probleme zu diskutieren.

Meiner direkten Betreuerin, Frau Dr. Marina Schorpp-Kistner, gilt mein besonderer Dank. Ihre intensive Betreuung, ihre ständige Gesprächsbereitschaft, Hilfe und Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher danke ich herzlich für die Übernahme des Referats und besonders für sein Interesse, die Fortschritte meiner Promotion zu verfolgen.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Marks spreche ich meinen Dank für die Übernahme des Korreferats aus.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die Zusammenarbeit, für wertvolle Ratschläge und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Danken möchte ich weiterhin allen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, stets zu ausgiebigen Diskussionen bereit waren und damit zur Entstehung dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Herrn Klaus Hexel danke ich herzlich dafür, daß er mir bei der Erlernung der FACS Analyse jederzeit unterstützend zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt möchte ich das größte Dankeschön meiner Familie zukommen lassen, die mich mit Interesse und Unterstützung durch die Promotion begleitet hat und ohne die das gesamte Studium in jeder Hinsicht undenkbar gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Sven Andrecht
Anschrift : Ortenauer Str. 4
D-69126 Heidelberg
geboren: 17. April 1972, in Neustadt a. Rbge., Deutschland
Eltern: Frau Ursula Andrecht, geb. Walla
Herr Heinrich Andrecht
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1978 - 1982 Grundschole Eilvese
1982 - 1984 Orientierungsstufe Neustadt a. Rbge.
1984 - 1991 Gymnasium Neustadt a. Rbge.
Juni 1991 Abitur

Wissenschaftliche Ausbildung:

Oktober 1991 Beginn des Studiums der Biologie in Hannover
September 1993 Vordiplom
Februar 1996 Diplomprüfungen
Mai 1996 - Diplomarbeit in der Abt. Molekularbiologie der
Januar 1997 Med. Hochschule Hannover bei Prof. Dr. Lüscher
ab Juni 1997 Dissertation in der Abteilung Signaltransduktion und
Wachstumskontrolle von Herrn Dr. Angel am
Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)

Eidesstaatliche Erklärung

Hiemit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, nur die erwähnten Hilfsmittel benutzt und die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Diese Arbeit wurde nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfarbeit verwendet wurde.

Sven Andrecht

